

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
SABER HAMDANI

LA MÉTHYLAMINE : UN MODÈLE POUR ÉTUDIER L'EFFET DES CHARGES
POSITIVES DE POLYAMINES SUR L'ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE

SEPTEMBRE 2011

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES (Ph. D.)

Programme offert à l'Université du Québec à Trois-Rivières

LA MÉTHYLAMINE : UN MODÈLE POUR ÉTUDIER L'EFFET DES CHARGES POSITIVES DE
POLYAMINES SUR L'ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE

PAR

SABER HAMDANI

<u>Robert Carpentier</u>	<u>Université du Québec à Trois-Rivières</u>
Directeur de recherche	

<u>Guy Samson</u>	<u>Université du Québec à Trois-Rivières</u>
Président de jury	

<u>Heidar-Ali Tajmir-Riahi</u>	<u>Université du Québec à Trois-Rivières</u>
Codirecteur de recherche	

<u>Philippe Juneau</u>	<u>Université du Québec à Montréal</u>
Évaluateur externe	

<u>William Zerges</u>	<u>Université Concordia</u>
Évaluateur externe	

Thèse soutenue le 14 juillet 2011

Je dédie ce modeste travail à tous ceux que j'aime...

À mes parents. Je les remercie de leur confiance et de leur amour. J'espère que le fruit de mes efforts leurs apporteront fierté...

À ma femme qui a su être là quand j'en avais besoin...

À mes adorables filles Eya et Zeïneb qui ont donné un sens à ma vie....

Je le dédie également à toute la famille Hamdani ainsi qu'à ma belle famille...

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier très chaleureusement le docteur Robert Carpentier qui a dirigé ce travail de thèse. Je le remercie pour m'avoir encadré avec enthousiasme et dynamisme dans ces idées prospères et pour avoir encouragé les miennes. Sa disponibilité, sa confiance et son ouverture aux discussions argumentées m'ont permis de trouver tout le soutien qui m'était nécessaire au cours de ces quatre années.

Je remercie également mon co-encadreur le docteur Heidar-Ali Tajmir-Riahi pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je vous remercie de m'avoir fait confiance et d'avoir rendu possible cette collaboration. Je vous remercie également de m'avoir initié à de nombreux domaines et d'avoir toujours cherché à faciliter mes conditions de travail.

J'aimerais également remercier toutes les personnes ayant participé à mes travaux de recherche durant ces années de doctorat pour leur aide et leur contribution inestimable, tout spécialement Johanne, Hnia, Najoua, Meha, Sri, Jemaa, Imed, David, Alain, Rémi et Steve, qui par leur présence également, ont rendu mon travail au laboratoire particulièrement intéressant.

Enfin, je remercie les membres du jury : Drs Philppe Juneau, William Zerges et Guy Samson qui ont accepté de juger ce travail de thèse.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire comporte quatre articles scientifiques. Les travaux présentés ont été effectués sous la supervision de mon directeur de recherche, le Professeur Robert Carpentier, et de mon codirecteur de recherche, le docteur Heidar Ali Tajmir-Riahi.

Dans le cadre de l'article intitulé "Interaction of methylamine with extrinsic and intrinsic subunits of Photosystem II" (chapitre III), j'ai effectué l'ensemble des manipulations menant aux résultats présentés dans cet article. J'ai analysé les résultats et rédigé l'article.

Dans le cadre de l'article intitulé "Methylamine interaction with proteins of photosystem II: A comparison with biogenic polyamines" (chapitre IV), le docteur H.A. Tajmir-Riahi a rédigé l'article. Pour ma part, j'ai effectué l'ensemble des manipulations menant aux résultats présentés dans cet article et analysé les résultats.

Dans le cadre de l'article intitulé "Positive charges of polyamines protect photosystem II in isolated thylakoid membranes during photoinhibitory conditions" (chapitre V), A. Gauthier a effectué les expériences du dégagement d'oxygène et de thermoluminescence, N. Misilini a réalisé l'expérience de fluorescence à 77K. Pour ma part, j'ai effectué les extractions biologiques, le traitement de la photoinhibition, toutes les mesures d'induction de fluorescence, le modeling et j'ai rédigé l'article.

Dans le cadre de l'article intitulé "Interaction of spermine with protein subunits confers greater protection of photosystem I compare to photosystem II against photoinhibition" (chapitre VI), J. Essemine a contribué à faire une partie de l'expérience de photooxydation de P700. Pour ma part, j'ai effectué la majorité des mesures présentées et j'ai rédigé l'article.

RÉSUMÉ

Les polyamines endogènes, telles que la spermine, la spermidine et la putrescine sont des composés organiques de faible poids moléculaire, présents dans la majorité des cellules vivantes, qu'elles soient eucaryotes ou procaryotes. Elles sont des amines aliphatiques très solubles dans l'eau et sont chargées positivement à pH physiologique. Elles peuvent interagir avec les macromolécules chargées négativement comme les acides nucléiques, les protéines et les phospholipides afin de réguler leurs propriétés physico-chimiques. Les polyamines ont plusieurs fonctions biologiques dans la régulation de la prolifération, de la différenciation cellulaire, mais aussi dans la réponse des organismes à différentes conditions de stress biotiques et abiotiques. Il a été montré que le niveau intracellulaire de polyamines dans les chloroplastes des plantes supérieures augmente en réponse au stress oxydatif, suggérant ainsi un rôle protecteur pour les polyamines. Cependant, les mécanismes exacts de cette protection font encore l'objet de débats.

Ce projet de recherche a donc pour objectif d'élucider les mécanismes d'action de polyamines, en se focalisant sur l'effet des charges positives sur l'activité photosynthétique. Pour y parvenir, une étude comparative entre trois amines, à savoir la spermine, la putrescine et la méthylamine a été réalisée dans des conditions *in vitro*. Cette étude comprend deux volets, un premier pour déterminer les sites et les modes d'action potentiels des amines et leurs effets sur l'activité photosynthétique, et un second pour élucider le rôle de charges positives des amines dans la protection de l'appareil photosynthétique contre la photoinhibition. Pour réaliser ce projet, plusieurs analyses spectroscopiques et biochimiques ont été utilisées à savoir, la mesure de l'induction de fluorescence, la thermoluminescence, le dégagement d'oxygène (standard et avec flash), la fluorescence des acides aminés, la spectroscopie FTIR, l'électrophorèse, et la photooxydation du P700.

La spectroscopie FTIR a permis de voir que les amines interagissent avec les groupes polypeptidiques C=O, C-N et N-H du côté lumen du PSII, en provoquant à forte concentration une inhibition de l'activité du dégagement d'oxygène et par la suite du transfert d'électrons à travers les cofacteurs du PSII. Cette inhibition était proportionnelle avec le nombre de charges positives des amines selon l'ordre spermine > putrescine > méthylamine.

L'application de 1 mM de spermine sur l'échantillon de thylakoïdes photoinhibé a permis une augmentation au niveau du ratio F_v/F_m , du dégagement d'oxygène, de la thermoluminescence et de la photooxydation du P700, suggérant ainsi un rôle protecteur pour la spermine. Cependant, l'effet des amines putrescine et méthylamine a été non significatif. Les résultats montrent donc que seule la spermine est capable de protéger l'appareil photosynthétique contre la photoinhibition, en stabilisant la conformation des protéines affectée par les formes actives de l'oxygène.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
AVANT-PROPOS.....	v
RÉSUMÉ.....	vi
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xvi
 CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 La photosynthèse chez les plantes supérieures.....	1
1.1.1 Définition et bilan	1
1.1.2 Le chloroplaste.....	1
1.1.3 Pigments photosynthétiques	4
1.1.4 Le photosystème II.....	7
1.1.4.1 Le complexe antennaire du photosystème II	8
1.1.4.2 Le centre réactionnel du photosystème II	10
1.1.4.3 Le site d'oxydation de l'eau	11
1.1.4.3.1 Les protéines extrinsèques	12
1.1.4.3.2 Mécanismes du dégagement d'oxygène.....	14
1.1.5 Le photosystème I.....	15
1.1.6 Le transfert d'électrons	17
1.1.7 Voies de dissipation d'énergie	18
1.1.8 La photoinhibition.....	19
1.1.9 Mécanismes de photoprotection	22
1.1.9.1 Mouvement des feuilles et des chloroplastes.....	22
1.1.9.2 Adaptation de l'appareil photosynthétique	23
1.1.9.3 Augmentation de la concentration de polyamines.....	27
1.2 Les polyamines endogènes	27
1.2.1 Généralités	27

1.2.2	Biosynthèse des polyamines	28
1.2.3	Interconversions de polyamines.....	29
1.2.4	Catabolisme de polyamines	30
1.2.5	Transport de polyamines.....	31
1.2.6	Régulation des niveaux intracellulaires en polyamines.....	32
1.2.7	Polyamines et cycle cellulaire.....	35
1.2.8	Polyamines et stress abiotiques.....	36
1.2.8.1	Polyamines et protection de l'appareil photosynthétique.....	37
1.3	Problématiques et objectifs du projet	39

CHAPITRE II

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....42

2.1	Matériel utilisé.....	42
2.2	Isolation des membranes de thylakoïdes	42
2.3	Isolation des fractions membranaires enrichies en PSII	42
2.4	Mesure du dégagement d'oxygène standard.....	43
2.5	Taux du dégagement d'oxygène induit par flash.....	44
2.6	Induction de fluorescence	45
2.7	Mesure de spectre de fluorescence à 77 K.....	45
2.8	La thermoluminescence	46
2.9	Mesure de changement d'absorption à 820 nm	46
2.10	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	47
2.10.1	Analyse de la structure secondaire par FTIR.....	48
2.11	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	49

CHAPITRE III

INTERACTION OF METHYLAMINE WITH EXTRINSIC AND INTRINSIC SUBUNITS OF PHOTOSYSTEM II.....50

Résumé.....	51
Abstract	53
Introduction.....	54
Materials and methods	56

Materials	56
Thylakoid membrane preparation.....	56
Isolation of PSII submembrane fractions	56
Polyacrylamide gel electrophoresis	57
Oxygen evolution.....	57
Chl fluorescence induction (FI).....	58
Thermoluminescence (TL)	58
Flash induced fluorescence.....	59
Results.....	59
Discussion	62
References	66
Figure legend.....	73

CHAPITRE IV

METHYLAMINE INTERACTION WITH PROTEINS OF PSII: A COMPARISON WITH BIOGENIC POLYAMINES.....80

Résumé.....	81
Abstract	83
Introduction.....	84
Results.....	85
Inhibition of oxygen evolution by MET	85
Action of MET on Chl fluorescence properties of PSII submembrane fractions	86
FTIR spectra of PSII/MET complexes	86
Amino-acid fluorescence spectra of PSII and thylakoid proteins with MET	88
Discussion	89
Experimental procedures.....	91
Materials	91
Isolation of PSII submembrane fractions	91
Oxygen evolution.....	92
Chl fluorescence induction (FI) measurements	92
FTIR measurements.....	92

Analysis of protein secondary structure	93
Amino-acid fluorescence spectroscopy	93
Acknowledgments.....	94
References.....	95
Figure legend.....	101

CHAPITRE V

POSITIVE CHARGES OF POLYAMINES PROTECT PHOTOSYSTEM II IN ISOLATED THYLAKOID MEMBRANES DURING PHOTOINHIBITORY CONDITIONS.....109

Résumé.....	110
Abstract	113
Introduction.....	114
Results.....	116
Discussion	119
Materials and methods	123
Materials	123
Thylakoid membrane preparation.....	123
Photoinhibitory treatment and amine addition	123
Oxygen evolution.....	123
Chl fluorescence induction (FI).....	124
Fluorescence spectroscopy	124
Thermoluminescence (TL)	125
Molecular modeling and docking	125
Acknowledgments.....	126
References.....	127
Figure legend.....	134

CHAPITRE VI

INTERACTION OF SPERMINE WITH PROTEIN SUBUNITS CONFERS GREATER PROTECTION OF PHOTOSYSTEM I COMPARE TO PHOTOSYSTEM II AGAINST PHOTOINHIBITION.....142

Résumé.....	143
-------------	-----

Abstract	145
Introduction	146
Materials and methods	147
Thylakoid membrane preparation.....	147
Photoinhibitory treatment and amine addition	147
Chl fluorescence induction (FI)	147
Redox state of P700	148
Results	148
Discussion	150
References	152
Figure legend.....	154
 CHAPITRE VII	
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	158
7.1 Sites d'action de la MET et son effet sur l'activité photosynthétique	158
7.2 Mode d'action de la MET	163
7.3 Comparaison entre la MET et les polyamines SPM et PUT	168
7.4 Rôle de charges positives des amines dans la protection des photosystèmes contre la photoinhibition.....	172
7.4.1 Effet des charges positives des amines sur l'activité du PSII inhibée par la photoinhibition.....	173
7.4.2 Rôle de charges positives des amines dans la protection du PSI contre la photoinhibition.....	179
7.5 Perspectives de recherche	182
 BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE	184

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Structure d'un chloroplaste (Tiré de la référence 2)	2
1.2 Distribution des complexes pigments-protéines à l'intérieur des thylakoïdes	3
1.3 Structure des chlorophylles <i>a</i> et <i>b</i> . Les chlorophylles <i>a</i> et <i>b</i> diffèrent par les substituants des groupements pyrroles. I, II, III, IV groupements pyrroles. V : cycle supplémentaire. La chaîne phytol n'a pas été détaillée	4
1.4 Structure d'un β carotène (A), d'une zéaxanthine (B) et d'une violaxanthine (C)	5
1.5 Spectre d'absorbance des pigments photosynthétiques en solution	6
1.6 Transfert d'excitation dans les LHC.....	7
1.7 Représentation schématique de la structure du PSII et de ses principaux cofacteurs (Tiré de la référence 7).....	8
1.8 Structure cristalline à 2.72 Å d'un trimère de LHCII liant les différents pigments. I-III : les trois monomères, vert : Chl <i>a</i> , bleu : Chl <i>b</i> , jaune : xanthophylle (Tiré de la référence 10).....	9
1.9 Structure macromoléculaire des protéines D1 et D2 et mise en évidence des acides aminés conservés. Les acides aminés conservés sont indiqués selon leur code à une lettre, les cercles rouges correspondent aux acides aminés non conservés, les cercles noirs aux résidus hydrophobes conservés et les carrés verts aux résidus hydrophiles conservés (Tiré de la référence 14)	11
1.10 Structure du "cluster" de Mn_4Ca et ses ligands. Les distances entre les atomes de Mn (rose) et de Ca (orange) sont indiquées par des lignes continues (gris : 2,7 Å, bleu : 3,3 Å, vert : 3,4 Å). Les amino-acides de la première sphère de coordination sont en noir et ceux de la seconde en gris. Les distances sont données en Å (Tiré de la référence 17).....	12
1.11 (A) Structure cristalline de la protéine PsbP de <i>Spinacea Oleracea</i> à 1.98 Å. (http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2VU4). (B) Structure cristalline de la protéine PsbQ de <i>Spinacea Oleracea</i> à 1.49 Å. (Tiré de référence 33)	14

1.12	En haut : Dégagement d'O ₂ induit par une série de flashes (Tiré de la référence 34). En bas : Cycle des états S (Tiré de la référence 35)	15
1.13	Représentation schématique de la structure du PSI et de ses principaux cofacteurs (Tiré de la référence 7)	16
1.14	Chaîne de transfert d'électrons (Tiré de la référence 7)	18
1.15	Diagramme de Jablonski simplifié de l'absorption d'énergie et des principales voies de dissipation en photosynthèse	19
1.16	(A) Dégradation de la protéine D1 par la FtsH. Le résidu Thréonine de la partie N-terminale subit une phosphorylation après un stress lumineux, puis subit une déphosphorylation par une phosphatase (P), ainsi commence la dégradation de la protéine D1 à partir de la partie N-terminale. (B) clivage de la protéine D1 au niveau de la boucle DE par la FtsH (Tiré de la référence 25)	21
1.17	Mécanismes de photoinhibition: (A) photoinhibition générée par le côté accepteur. (B) photoinhibition générée par le côté donneur (Tiré de la référence 25)	22
1.18	Mouvements des feuilles et des chloroplastes en réponse à un stress lumineux	23
1.19	Migration des monomères phosphorylés des LHCII du PSII des zones granaires vers les régions non empilées. Etat 1 : LHCII non phosphorylé, associé au PSII. Etat 2 : LHCII phosphorylé associé au PSI.....	25
1.20	(A) Endommagement des PSII par les FAO, suite à un stress lumineux. (B) Transformation de la membrane des thylakoïdes, induite par la forte luminosité, facilitant la migration des PSII endommagés vers les margines et les lamelles stromatiques (Tiré de la référence 49)	26
1.21	Structure de polyamines endogènes.....	27
1.22	Voies de biosynthèse de polyamines au sein des plantes, des animaux et des bactéries indiquées par des flèches vertes, bleues et rouges respectivement (Tiré de la référence 55)	29
1.23	Voies de dégradation de polyamines au sein des plantes, des animaux et des bactéries indiquées par des flèches vertes, bleues et rouges respectivement (Tiré de la référence 55)	31
1.24	Modalités de régulation de l'enzyme ODC. AZ : inhibiteur de l'ODC, AZIN : inhibiteur de l'antizyme (Tiré de la référence 69).....	33

1.25	Régulation de l'enzyme SAMDC chez les plantes (Tiré de la référence 74).....	34
2.1	Électrode d'oxygène de Clark	44
2.2	Fluorimètre PAM-101	47
7.1	Effet de l'addition de 30 mM d'amines sur la fluorescence initiale F_0	170
7.2	50 % d'inhibition du dégagement d'O ₂ et du ratio F_v/F_m (Tiré de la référence 152).....	172
7.3	Modèle proposé de la protection de la SPM durant la photoinhibition (Tiré de la référence 152)	178

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADC	Arginine décarboxylase
AZ	Ornithine antizyme
CEO	Complexe d'évolution d'oxygène
Chl	Chlorophylle
CP43	Antenne interne de 43 kDa
CP47	Antenne interne de 47 kDa
CR	Centre réactionnel
DCBQ	2,5-dichlorobenzoquinone
DCMU	3 -(3' ,4' -dichlorophényl)-1,1 –diméthylurée
DPC	Diphénylcarbazine
FAO	Forme active de l'oxygène
F ₀	Niveau minimal de fluorescence
F _m	Niveau maximal de fluorescence
F _v	Fluorescence variable
Fd	Ferrédoxine
FeCN	Potassium ferricyanide
FNR	Ferrédoxine-NADP-reductase
FTIR	Infrarouge à transformée de Fourier
LHC	Antenne photocollectrice de lumière périphérique
MET	Méthylamine
ODC	Ornithine décarboxylase
P680	Donneur primaire d'électrons du photosystème II
P700	Donneur primaire d'électrons du photosystème I
PAO	Polyamine-oxydase
PC	Plactocyanine
Phé	Phéophytine
PQ	Plastoquinone
PSI	Photosystème I

PSII	Photosystème II
PsbA	Protéine D1 du photosystème II
PsbD	Protéine D2 du photosystème II
PsbO	Protéine extrinsèque de 33 kDa
PsbP	Protéine extrinsèque de 24 kDa
PsbQ	Protéine extrinsèque de 17 kDa
PUT	Putrescine
qE	Quenching de haute énergie
qI	Quenching de photoinhibition
qT	Quenching dû à la transition d'états
Q _A	Quinone acceptrice primaire du photosystème II
Q _B	Quinone acceptrice secondaire du photosystème II
SPM	Spermine
SAM	S-adénosyl-méthionine
SAMDC	S-adénosyl-méthionine décarboxylase
SSAT	N ¹ -acétyl-transférase
Y _Z	Tyrosine Z; donneur d'électron principal du P680

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La photosynthèse chez les plantes supérieures

1.1.1 Définition et bilan

La photosynthèse est un processus biologique capable de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique. Plusieurs organismes vivants, appelés autotrophes, peuvent effectuer ces réactions à savoir : les plantes, les algues, les cyanobactéries et certaines bactéries. Ce processus est accompagné par le dégagement d'oxygène (O₂) et la synthèse des glucides suite à l'oxydation de l'eau et la réduction du dioxyde de carbone (CO₂) :



Cette réaction globale de photosynthèse se déroule en deux phases : (I) La phase lumineuse durant laquelle la lumière absorbée par la plante va générer un transfert d'électron, via différents sites de la machine photosynthétique, ce qui permet la production d'O₂ moléculaire, la formation de réserve d'adénosine triphosphate (ATP) et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH). (II) La phase sombre caractérisée par la fixation de CO₂ par une enzyme spécifique appelée Rubisco et la synthèse des hydrates de carbone par le cycle de Calvin. Durant cette phase, l'ATP et le NADPH sont utilisés comme sources d'énergie. L'ensemble de ces réactions se déroule dans un organite appelé chloroplaste.

1.1.2 Le chloroplaste

Le chloroplaste est un organite cellulaire présent essentiellement dans le mésophylle de la feuille, il est composé d'une double membrane lipidique qui sert

comme siège de la photosynthèse. La membrane interne ou thylakoïde forme des invaginations, des repliements et des empilements (Figure 1.1).

Les thylakoïdes sont constitués d'un ensemble de vésicules aplaties dénommées lamelles qui sont empilées pour former les granas (10 à 20 lamelles). Les granas sont reliés entre eux par des lamelles simples non empilées, exposées à la phase aqueuse interne du chloroplaste appelée stroma (1). C'est dans le stroma que se retrouvent les enzymes servant à la phase sombre de la photosynthèse. L'espace présent à l'intérieur du thylakoïde est désigné par lumen.

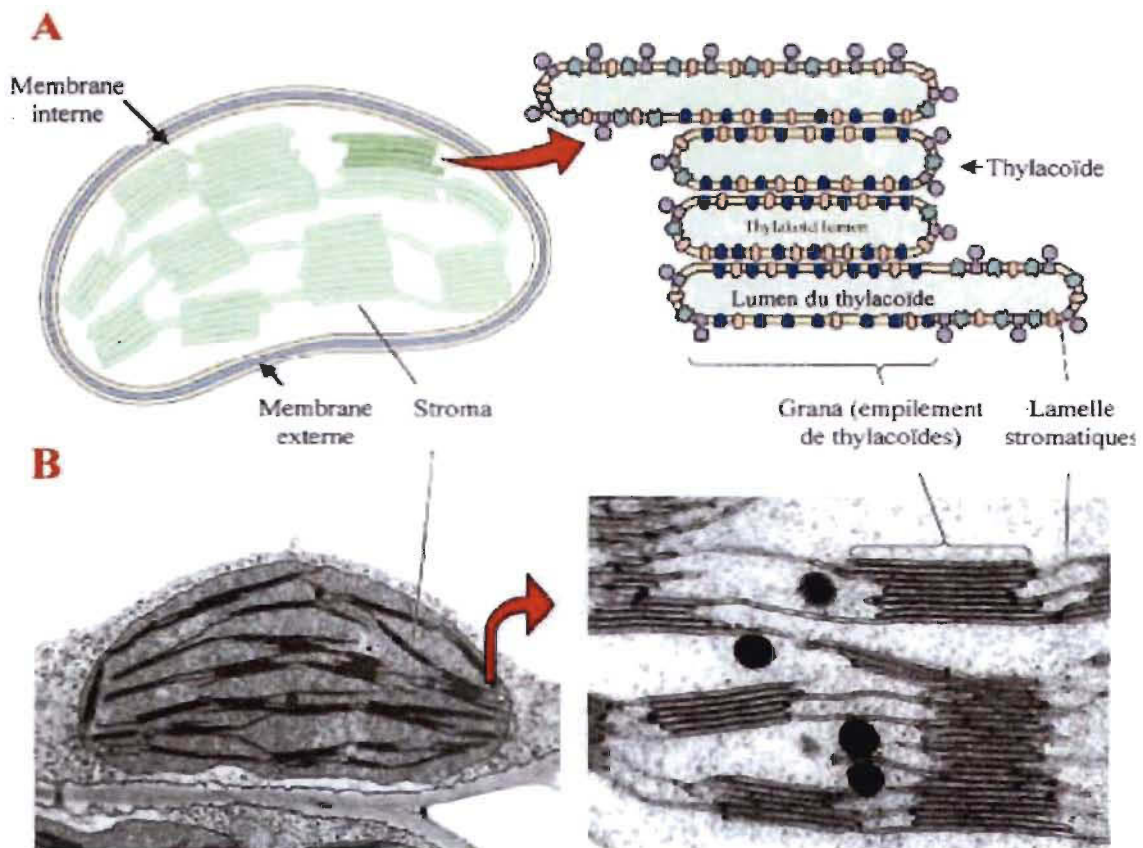


Figure 1.1 : Structure d'un chloroplaste (Tiré de la référence 2).

On distingue dans les membranes des thylakoïdes différents complexes de pigments-protéines qui contribuent aux réactions photochimiques et au transport d'électrons photosynthétiques : (i) Les antennes collectrices de lumière "light harvesting complexes" (LHC) formées de pigments photosynthétiques liés à des protéines

membranaires; (ii) Les centres réactionnels du photosystème II (PSII) et du photosystème I (PSI), dans lesquels se déroulent les réactions photochimiques; (iii) Les transporteurs d'électrons situés entre le PSII et le PSI, composés de plastoquinones (PQ), de cytochromes b6f et de plastocyanines (PC); (iv) Le système enzymatique d'ATP synthétase (2). Ces complexes de pigments-protéines ne sont pas distribués uniformément dans les membranes de thylakoïdes. En effet, les complexes du PSII (dimère) et leurs LHCII (oligomère) se situent en majorité dans le granum, alors que les PSII (monomère), les PSI et leurs LHCI ainsi que l'ATP synthétase se situent dans les lamelles stromatiques et les régions marginales du granum (3) (Figure 1.2).

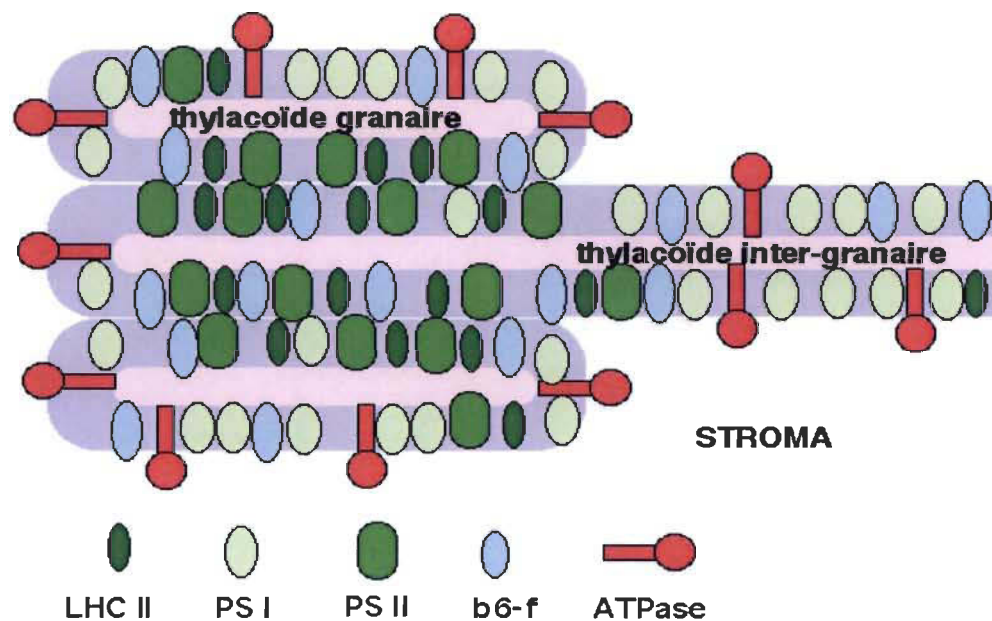


Figure 1.2 : Distribution des complexes pigments-protéines à l'intérieur des thylakoïdes.

Il a été suggéré que la ségrégation entre le PSII et le PSI sert à éviter la captation de l'excitation par le PSI, qui est moins efficace pour la photosynthèse (4). Les cytochromes b6f peuvent exister dans le granum ainsi que dans les lamelles stromatiques.

1.1.3 Pigments photosynthétiques

L'absorption de la lumière est effectuée par les complexes protéiques LHC aussi appelés antennes photocollectrices de lumière. Ces antennes périphériques sont associées aux PSI et PSII, auxquels elles acheminent l'énergie lumineuse absorbée par les chlorophylles (Chl) *a* et *b* et les caroténoïdes (5).

✓ Les Chls : Elles sont constituées d'un noyau tétrapyrrolique, avec un magnésium au centre, auquel est fixée une queue phytol à très longue chaîne de carbone (C₂₀). L'absorption de la lumière par ces Chls est due à l'existence de doubles liaisons conjuguées (Figure 1.3).

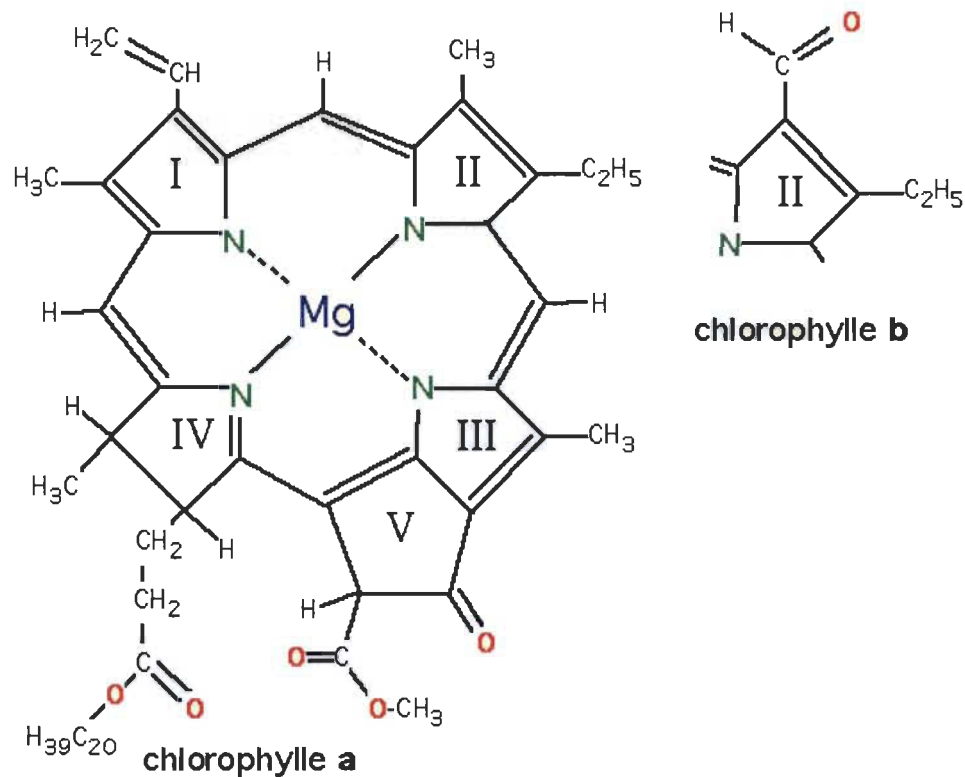


Figure 1.3 : Structure des chlorophylles *a* et *b*. Les chlorophylles *a* et *b* diffèrent par les substituents des groupements pyrroles. I, II, III, IV groupements pyrroles. V : cycle supplémentaire. La chaîne phytol n'a pas été détaillée.

✓ Les caroténoïdes : Les caroténoïdes sont des molécules terpéniques à 40 carbones caractérisées par leurs longues chaînes carbonées à doubles liaisons conjuguées. Parmi les caroténoïdes on cite : (I) le β carotène, qui est une molécule constituée de 40 carbones, avec deux extrémités cyclisées reliées par une longue chaîne de 8 unités isoprènes. (II) les xanthophylles qui sont des formes oxydées avec deux hydroxyles (OH) en extrémité pour les lutéines et les zéaxanthines, 2 époxydes et 2 (OH) pour les violaxanthines, et 3 (OH) et un époxyde pour les néoxanthines (Figure 1.4).

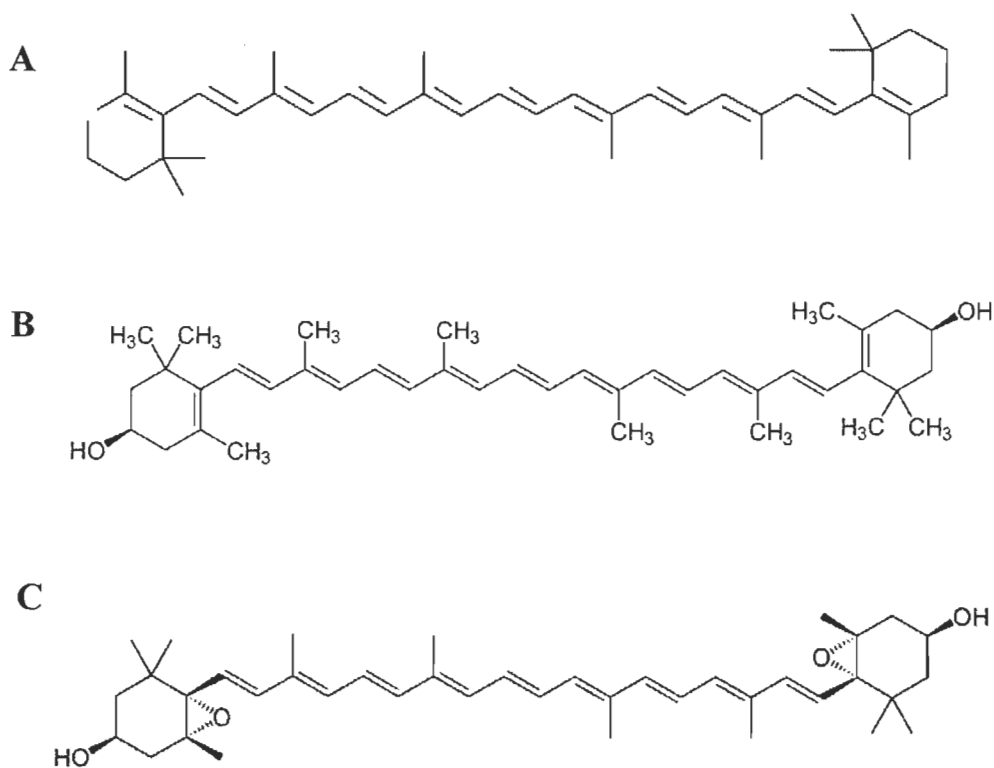


Figure 1.4 : Structure d'un β carotène (A), d'une zéaxanthine (B) et d'une violaxanthine (C).

Le spectre d'absorbance de l'énergie lumineuse, par les différents pigments photosynthétiques, peut couvrir une grande partie du domaine visible de la lumière (400-700 nm). Cette propriété permet une utilisation efficace de l'énergie lumineuse pour la photosynthèse (Figure 1.5).

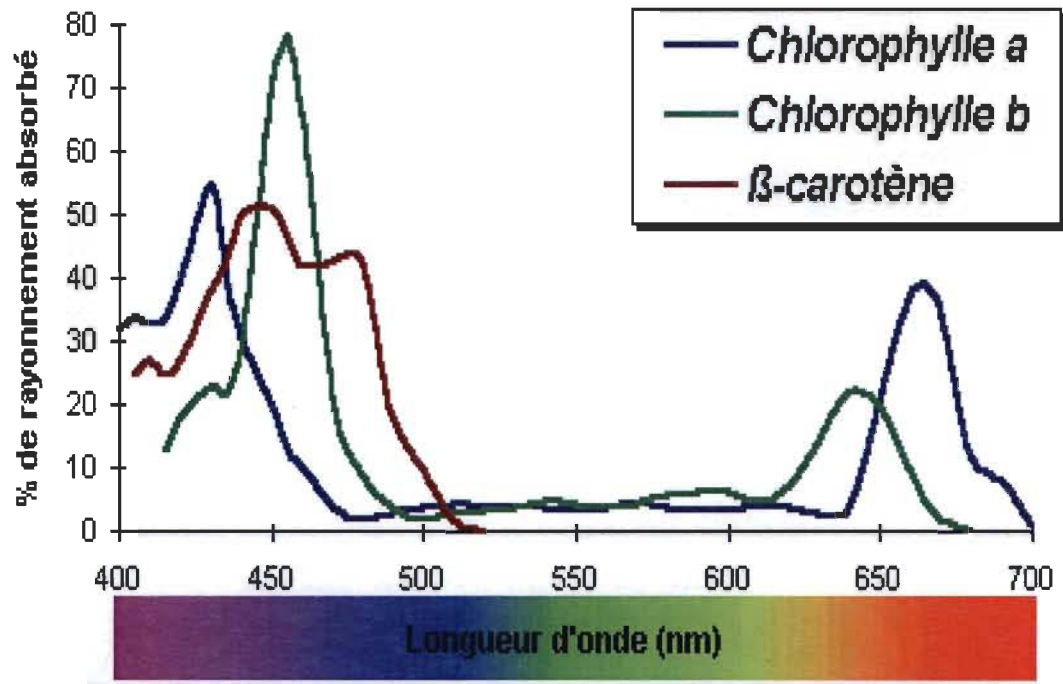


Figure 1.5 : Spectre d'absorbance des pigments photosynthétiques en solution.

Lorsque une des Chls situées dans les LHCII du PSII absorbe un photon, l'énergie d'excitation est transférée aléatoirement d'un pigment à un autre jusqu'à la paire spéciale de Chl *a* (P680). Cette dernière est capable de céder un de ses électrons à l'accepteur primaire, la phéophytine (Phé), ainsi s'effectue le processus de séparation de charges qui va déclencher par la suite le transfert d'électrons photosynthétiques (Figure 1.6).

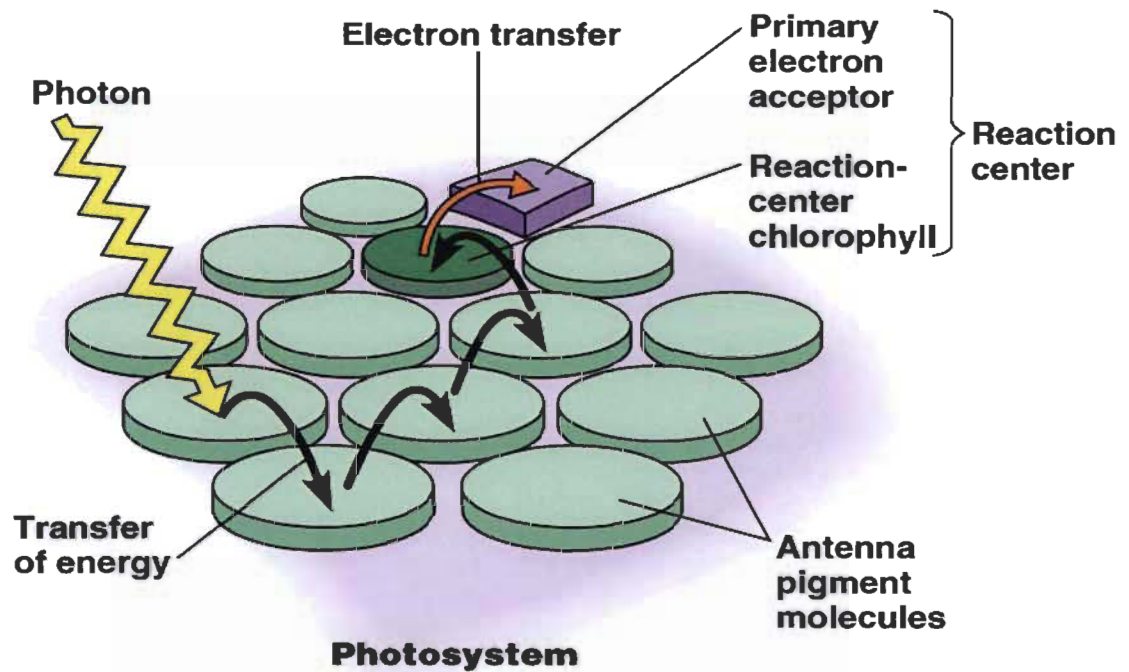


Figure 1.6 : Transfert d'excitation dans les LHC.

1.1.4 Le photosystème II

Le PSII est un complexe protéique d'une masse de 320 kDa pour un monomère. Il est composé de plus de 16 sous-unités transmembranaires, trois protéines extrinsèques et des cofacteurs, incluant des Chls, des caroténoïdes, des PQs et des atomes de manganèse (Mn). Le "cluster" de Mn et les protéines extrinsèques participent au mécanisme de l'oxydation de l'eau et du dégagement d'O₂. Le centre réactionnel (CR) du PSII est principalement composé d'un hétérodimère protéique constitué des protéines D1 (PsbA) et D2 (PsbD), renfermant six Chls *a* et deux Phés, et de deux antennes intrinsèques à savoir CP43 et CP47 (6). Ces antennes facilitent le transfert de l'excitation entre les antennes périphériques et le CR (Figure 1.7).

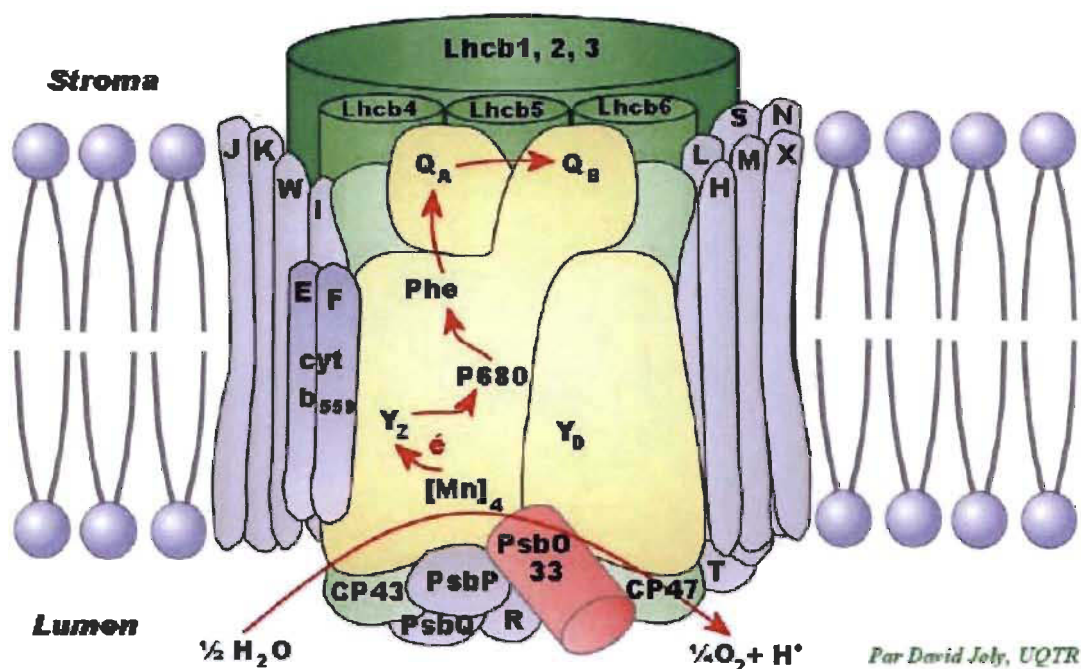


Figure 1.7 : Représentation schématique de la structure du PSII et de ses principaux cofacteurs (Tiré de la référence 7).

1.1.4.1 Le complexe antennaire du photosystème II

Le complexe antennaire du PSII chez les plantes supérieures comprend trois antennes distinctes :

- *Les antennes périphériques (LHCII) :*

Elles sont constituées de pigments associés à des protéines de 24 à 29 kDa que l'on peut regrouper en 3 familles; chacune est codée par un gène nucléaire appelé Lhcb (Lhcb1 à Lhcb3). Ces protéines lient la Chl *a* et la Chl *b* ainsi que des molécules de caroténoïdes, comme la lutéine, la néoxanthine, la violaxanthine et la zéaxanthine. Il a été proposé que le complexe LHCII contienne entre 50 à 60 % de la quantité totale de la Chl (*a* et *b*) et à peu près 30 % des protéines de la membrane des thylakoïdes (8). En plus, la taille de ces antennes ainsi que la composition pigmentaire peuvent varier en fonction des conditions lumineuses auxquelles les plantes sont exposées (9) (Figure 1.8).

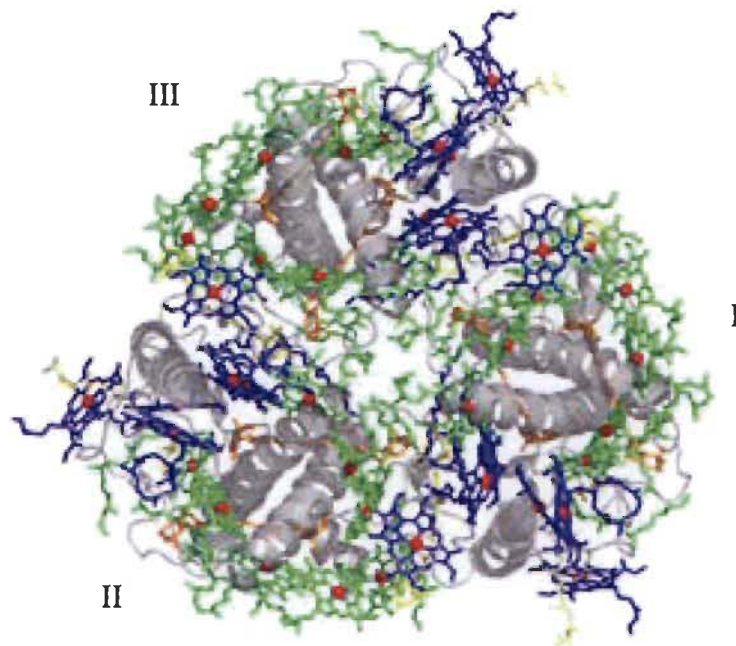


Figure 1.8 : Structure cristalline à 2.72 Å d'un trimère de LHCII liant les différents pigments. I-III : les trois monomères, vert : Chl *a*, bleu : Chl *b*, jaune : xanthophylle. (Tiré de la référence 10).

- Les antennes intermédiaires :

Elles sont constituées des complexes protéines-pigments codés par les gènes *Lhcb4* (ou CP29), *Lhcb5* (ou CP26) et *Lhcb6* (ou CP24). Les complexes CP29 et CP26 sont attachés au CR tandis que le CP24 est associé aux LHCII. Ces antennes sont moins riches en Chls par rapport aux LHCII, elles contiennent 5 à 10 % de la Chl totale du PSII (11), mais plus riches en xanthophylles. Le rôle essentiel de ces antennes est de transférer l'énergie d'excitation du LHCII au CR via les antennes internes (12).

- Les antennes internes :

Elles renferment deux protéines dites CP43 et CP47, codées par les gènes chloroplastiques *PsbC* et *PsbB* respectivement. Environ 40 à 50 molécules de Chls *a* et à une dizaine de molécules de β -carotène se lient à ces protéines (11). Elles sont étroitement associées au CR du PSII et permettent le transfert de l'énergie lumineuse

vers la paire spéciale de Chl (P680). La protéine CP47, liée au polypeptide extrinsèque de 33 kDa (ou bien PsbO) du complexe d'évolution d'oxygène (CEO), est impliquée dans la stabilisation du "cluster" de Mn (13).

1.1.4.2 Le centre réactionnel du photosystème II

Le CR est principalement constitué de deux protéines majeures appelées D1 et D2, codées par les gènes chloroplastiques PsbA et PsbD respectivement. Ces protéines exhibent une grande similitude entre elles comme la présence de cinq hélices transmembranaires, mais ne sont pas identiques (Figure 1.9). Elles contiennent les cofacteurs nécessaires pour le transfert d'électrons tels que : la paire spéciale de Chl α (P680), la Tyr_Z et les PQs (Q_A et Q_B). En effet, le processus de séparation de charge est initié au niveau de la protéine D1 par le couple P680/Phé, puis l'électron est ensuite transmis à Q_A (PQ fixée sur D2) puis de Q_A à Q_B (PQ située dans un site de liaison sur D1) pour enfin être acheminé au PSI. La protéine D1 renferme aussi le site d'oxydation de l'eau, qui est assuré par le CEO.

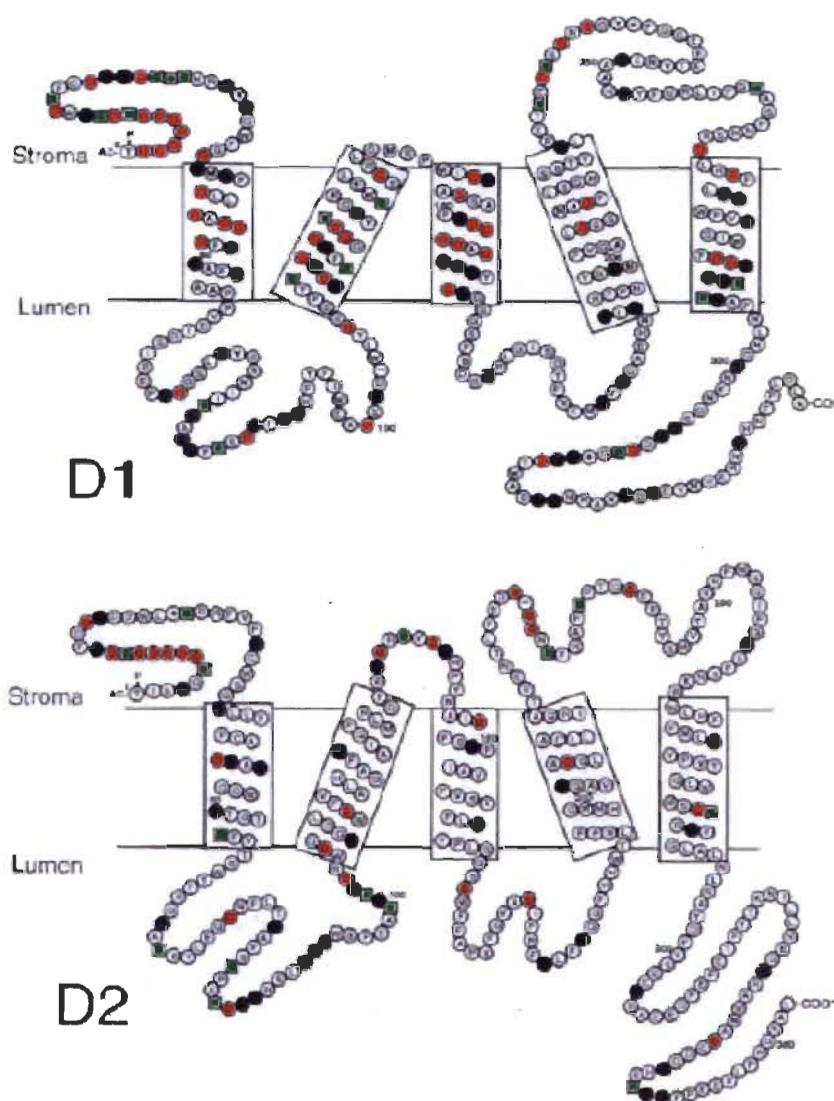


Figure 1.9 : Structure macromoléculaire des protéines D1 et D2 et mise en évidence des acides aminés conservés. Les acides aminés conservés sont indiqués selon leur code à une lettre, les cercles rouges correspondent aux acides aminés non conservés, les cercles noirs aux résidus hydrophobes conservés et les carrés verts aux résidus hydrophiles conservés (Tiré de la référence 14).

1.1.4.3 Le site d'oxydation de l'eau

Le mécanisme d'oxydation de l'eau est assuré par le CEO qui est composé de quatre atomes de Mn incluant aussi un atome de Ca^{2+} et un atome de Cl^- (15,16) (Figure 1.10). Ce complexe est logé dans une cavité de la protéine D1 limitée du côté de

lumen par les protéines extrinsèques. Ce sont des protéines hydrophiles de poids moléculaires 33, 24 et 17 kDa, appelées aussi : PsbO, PsbP et PsbQ respectivement.

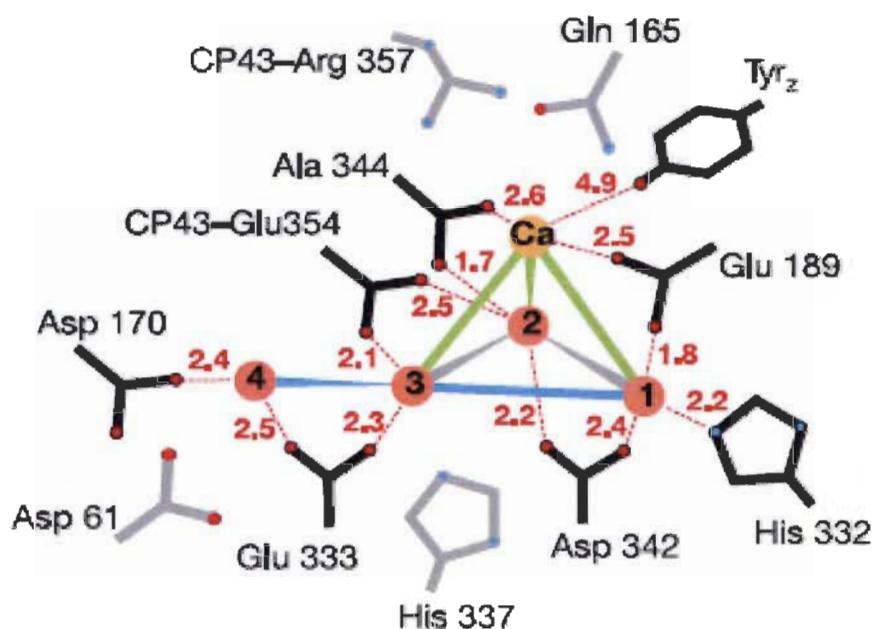


Figure 1.10 : Structure du "cluster" de Mn_4Ca et ses ligands. Les distances entre les atomes de Mn (rose) et de Ca (orange) sont indiquées par des lignes continues (gris : 2,7 Å, bleu : 3,3 Å, vert : 3,4 Å). Les amino-acides de la première sphère de coordination sont en noir et ceux de la seconde en gris. Les distances sont données en Å. (Tiré de la référence 17).

1.1.4.3.1 Les protéines extrinsèques

- La protéine PsbO (33 kDa) :

La protéine extrinsèque de 33 kDa est codée par le gène PsbO et présente dans tous les organismes photosynthétiques (18,19). Chez *Arabidopsis thaliana*, elle est encodée par les deux isoformes PsbO-1 et PsbO-2. L'isoforme PsbO-1 est plus exprimé dans la plante et joue le rôle le plus important dans la stabilité du "cluster" de Mn, alors que l'isoforme PsbO-2 est impliqué dans le processus de la dégradation de la protéine D1, en facilitant l'accès aux phosphatases et protéases lors de la photoinhibition (20). L'étude comparative entre les séquences de la protéine PsbO de 22 espèces différentes a

montré que les acides aminés sont hautement conservés avec plus de 43 % des acides aminés identiques (21). Il a été suggéré que la région N-terminale de la protéine PsbO est liée à la boucle "loop" E de la protéine CP47 (22). De plus, une grande partie de la protéine PsbO interagit avec la protéine D1 afin de la stabiliser durant la photoinhibition (23-25).

Le rôle principal de la protéine PsbO est de stabiliser la structure du "cluster" de Mn tout en participant à la régulation des cofacteurs Ca^{2+} et Cl^- nécessaires au dégagement d' O_2 , d'où le nom de "Manganese Stabilizing Protein". En effet, l'enlèvement de la protéine PsbO du PSII peut provoquer une déstabilisation au niveau de "cluster" de Mn allant jusqu'à la perte de deux à quatre atomes de Mn (26,27). Il est connu que les cofacteurs Ca^{2+} et Cl^- sont indispensables à l'activité du CEO. Cependant, l'implication de la protéine PsbO dans la fixation de ces cofacteurs au CEO reste controversée. En effet, certains auteurs ont suggéré que la PsbO sert à fixer le Ca^{2+} au CEO (28), alors que d'autres ont démontré que l'affinité entre le Ca^{2+} et le CEO reste intacte même en absence de la protéine PsbO (29).

- *Les protéines PsbP et PsbQ :*

Les plantes supérieures ainsi que les algues vertes possèdent les protéines extrinsèques PsbP et PsbQ (Figure 1.11), alors que les cyanobactéries utilisent deux autres protéines extrinsèques homologues appelées PsbU et PsbV (30). La protéine PsbP (24 kDa) permet de maintenir la structure et l'activité du CEO en fixant les atomes de Ca^{2+} et Cl^- indispensables au dégagement d' O_2 , tout en protégeant le complexe de Mn des agents réducteurs exogènes (16). Il a été suggéré que la protéine PsbP contribue à l'assemblage du complexe de Mn lors de la photoactivation du PSII (31). À son tour, la protéine PsbQ (17 kDa) permet de stabiliser le CEO surtout en absence de Ca^{2+} et Cl^- (32).

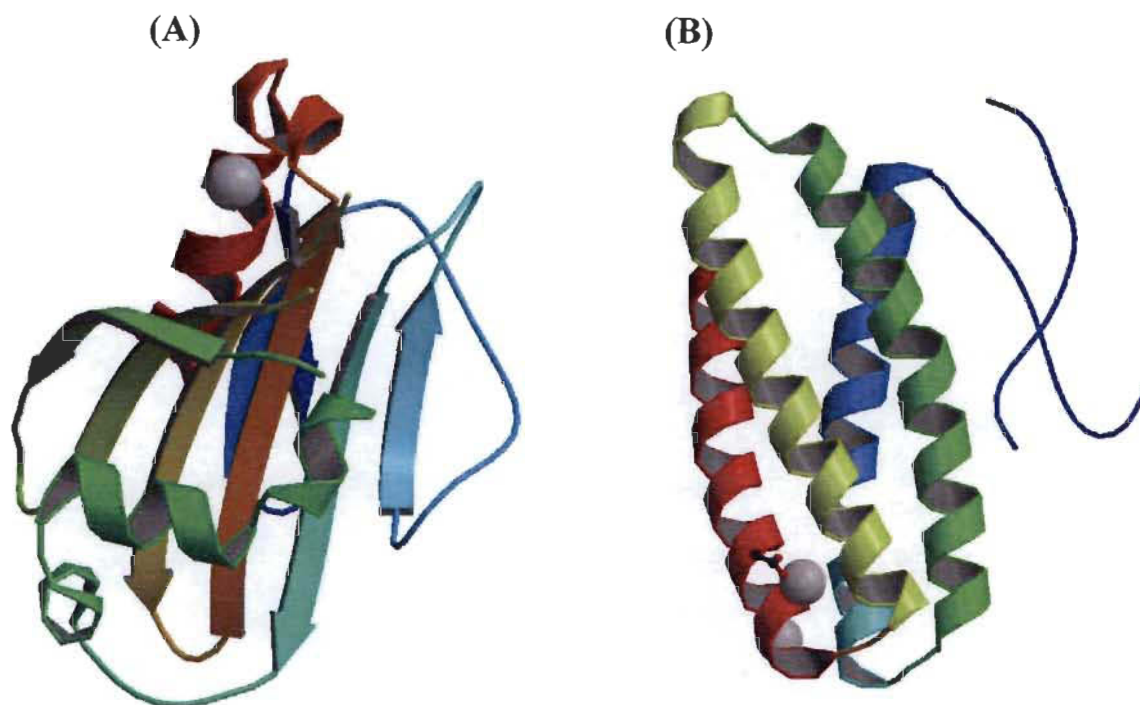


Figure 1.11 : (A) Structure cristalline de la protéine PsbP de *Spinacea Oleracea* à 1.98 Å.
 (<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2VU4>).
 (B) Structure cristalline de la protéine PsbQ de *Spinacea Oleracea* à 1.49 Å. (Tiré de référence 33).

1.1.4.3.2 Mécanisme du dégagement d'oxygène

Le mécanisme du dégagement d'O₂ a été investigué par la mesure de la quantité d'O₂ produite par des chloroplastes éclairés par une série de flashes actiniques courts. Il a été remarqué que les deux premiers flashes ont induit une faible quantité d'O₂, alors que le maximum du dégagement d'O₂ a été observé après le troisième flash et tous les quatre flashes. Cette expérience a mené au développement du modèle de Kok qui décrit le fonctionnement du "cluster" de Mn. Dans ce modèle, le "cluster" de Mn passe par 5 états appelés états S, individuellement désignés par S_n, où n = 0 à 4. Chaque état S_n représente un état d'oxydation différent du CEO. L'enzyme est ainsi capable de stocker 4 équivalents de charges positives (correspondant aux 4 photoréactions par le PSII), avant d'oxyder 2 molécules d'H₂O et de dégager de l'O₂. L'état S₁ est celui qui est stable à l'obscurité (Figure 1.12).

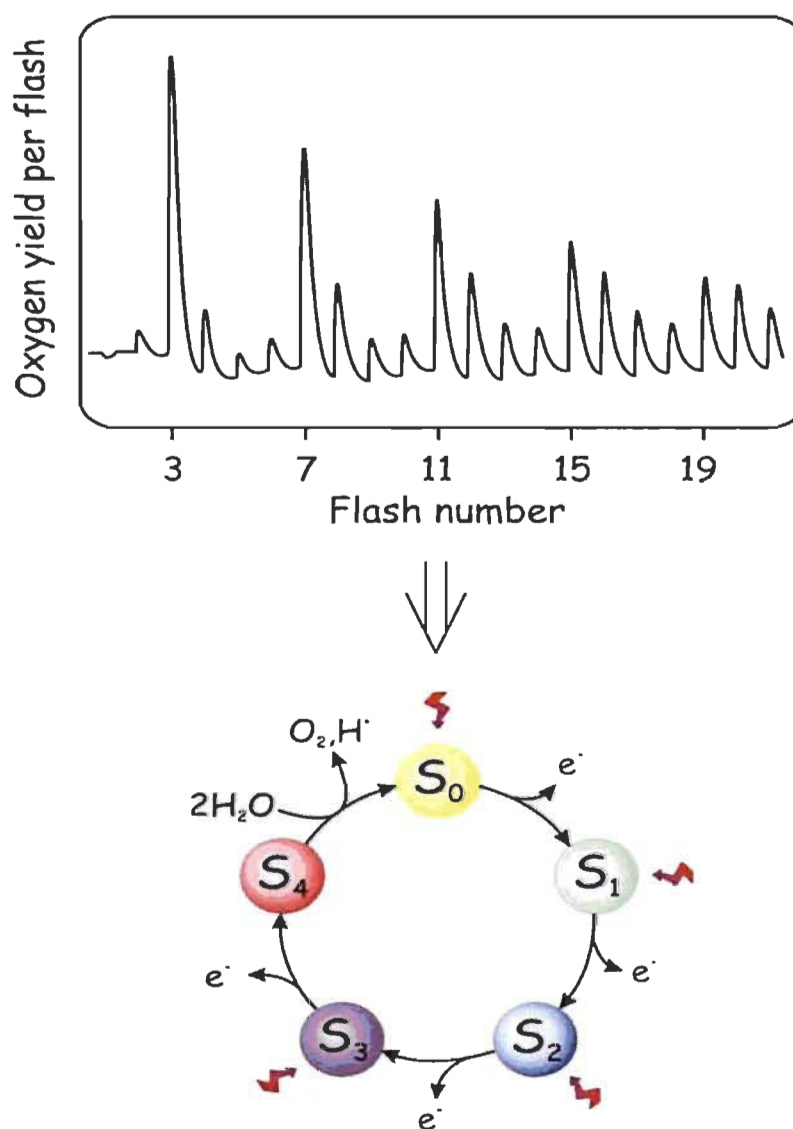


Figure 1.12 : En haut : Dégagement d' O_2 induit par une série de flashes (Tiré de la référence 34). En bas : Cycle des états S (Tiré de la référence 35).

1.1.5 Le photosystème I

Le PSI est composé d'un complexe antennaire externe et d'une antenne interne entourant le CR pour une masse totale du complexe d'environ 525 kDa (36). Les antennes externes à savoir : LHCI-680 et LHCI-730 (correspondant à la position des maxima de fluorescence des complexes dans le rouge) sont constituées de 4 sous-unités protéiques associées en dimères : LHCA1-LHCA4 (correspondant au LHCI-680) et

1.1.6 Le transfert d'électrons

Le PSII contient une paire spéciale de Chl (P680) qui, lorsqu'elle reçoit une excitation lumineuse en provenance des antennes, perd son électron excité. L'électron perdu passe par une molécule de Phé avant d'aller réduire une molécule de PQ (Q_A) fixée sur D2. L'électron passe ensuite de Q_A à une seconde PQ située dans un site de liaison sur D1 appelé Q_B . Ces intermédiaires forment ce qu'on appelle le côté accepteur du PSII. Pour que le PSII soit de nouveau fonctionnel, le P680 oxydé ($P680^+$) doit récupérer un électron du résidu Y_Z de la protéine D1, qui sera réduit à son tour par le CEO. Ce complexe est capable d'arracher les électrons aux molécules d'eau en libérant des protons (H^+) et d' O_2 . Ces intermédiaires, qui ont pour rôle la réduction du $P680^+$, forment alors ce qu'on appelle le côté donneur du PSII.

Après une seconde excitation, l'accepteur Q_B se retrouve dans un état doublement réduit (Q_B^{2-}), ce qui provoque sa protonation (Q_BH_2) et sa libération du site Q_B . Par la suite, les molécules Q_BH_2 réduisent les cytochromes b6f en libérant deux protons dans le lumen de thylakoïde. Cette réaction participe à la formation de gradient de protons qui induit la synthèse de l'ATP. Les électrons reçus par les cytochromes b6f seront ensuite transférés à la PC, puis au $P700^+$ du PSI. L'accepteur primaire d'électrons dans le PSI est une Chl située sur la sous-unité PsaA appelée A_0 , qui transfère l'électron sur une molécule de phylloquinone nommée A_1 . Après avoir atteint A_1 , l'électron sera transféré tour à tour sur une série de trois complexes fer-soufre (Fe_4S_4), F_x , F_A , et F_B . Par la suite, F_B réduira un transporteur protéique soluble, Fd, qui elle-même ira réduire le $NADP^+$ en NADPH dans une réaction catalysée par l'enzyme FNR (Figure 1.14). L'ATP et le NADPH pourront être utilisés dans la phase sombre de la photosynthèse (37).

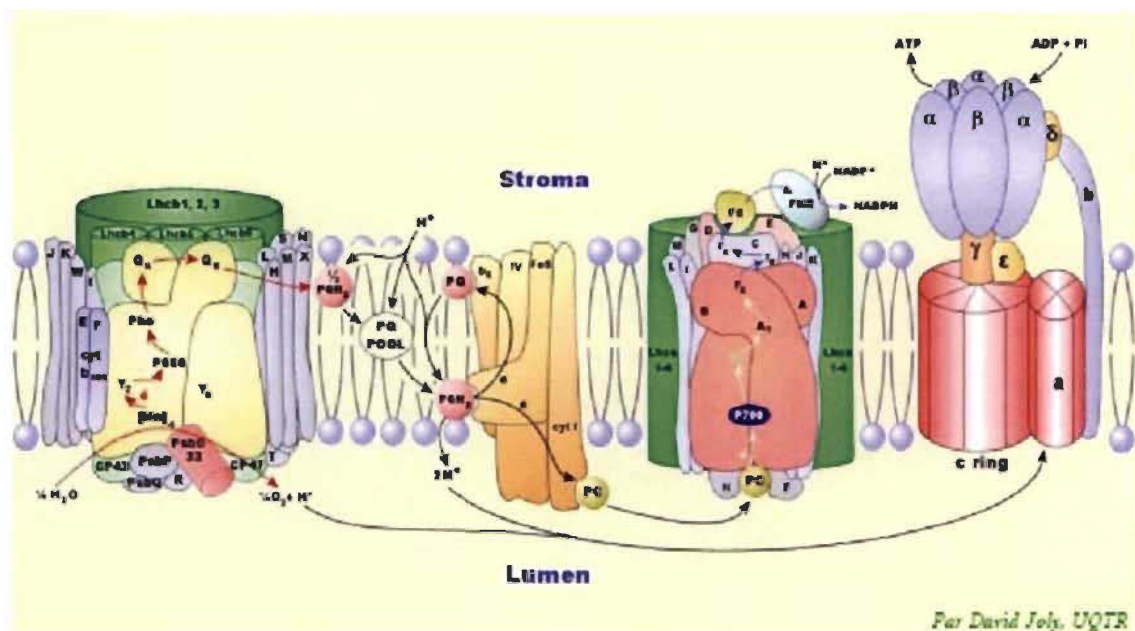


Figure 1.14 : Chaîne de transfert d'électrons (Tiré de la référence 7).

1.1.7 Voies de dissipation d'énergie

La lumière absorbée par la plante peut engendrer des transitions électroniques dans les molécules excitable. Une fois excité, l'électron aura tendance à retourner à son état le plus stable (état fondamental S_0). Pour ce faire, il existe plusieurs voies de désexcitation possibles, en compétition les unes avec les autres (Figure 1.15). L'électron excité peut être utilisé dans les processus photochimiques, d'où le nom de "quenching" photochimique. L'électron excité peut aussi réémettre un photon: il s'agit de la fluorescence. Finalement, l'excitation peut se perdre sous forme du dégagement de chaleur, qui est une voie dissipative importante dans la protection de la machine photosynthétique, on parle de "quenching"-non photochimique (NPQ).

Lorsque l'influx lumineux est très élevé par rapport à la capacité de la machine photosynthétique, la vitesse du transfert d'électrons diminue et la probabilité d'une recombinaison augmente. Ce qui peut entraîner la formation de Chls à l'état triplet (^3Chl) capables d'interagir avec l' O_2 ambiant pour donner naissance à l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Ce dernier peut occasionner des dégâts à l'appareil photosynthétique. Une

telle inhibition de la photosynthèse causée par une forte lumière est appelée photoinhibition.

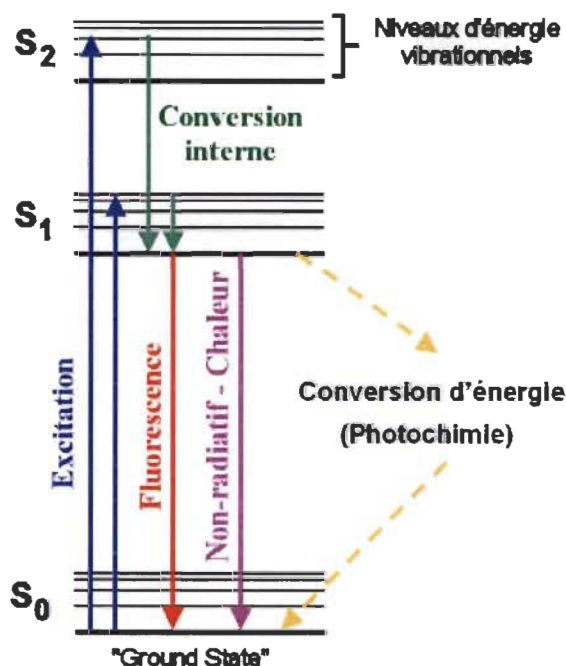


Figure 1.15 : Diagramme de Jablonski simplifié de l'absorption d'énergie et des principales voies de dissipation en photosynthèse.

1.1.8 La photoinhibition

Le processus de photoinhibition est observé dans la nature lorsque les plantes sont obligées à faire face à des conditions d'éclairement très intenses. Ce stress lumineux est accompagné généralement de la production intense des formes actives de l'oxygène (FAO), capables de déclencher la dégradation de plusieurs composantes de la membrane de thylakoïdes. Cette altération peut entraîner une baisse d'activité des photosystèmes, et par la suite du rendement photosynthétique. Il a été signalé que le PSII est plus touché par la photoinhibition que le PSI, surtout dans les conditions *in vivo* (25,38). Cependant, le mécanisme exact expliquant la photoinhibition reste méconnu.

De plus, plusieurs auteurs ont suggéré que le côté accepteur du PSII est le site initial de la photoinhibition (39-41). Alors que d'autres auteurs ont prouvé que le côté donneur est le déclencheur de la photoinhibition (42-44).

- *Photoinhibition déclenchée au niveau du côté accepteur du PSII :*

Suite à une forte luminosité, le côté accepteur du PSII peut rester réduit plus longtemps, favorisant l'interaction avec l' O_2 et produisant le radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}). Ces FAO peuvent stimuler la dégradation des pigments, la peroxydation des lipides et la dégradation des protéines. La protéine D1 est probablement la cible la plus importante des FAO. En effet, l'oxydation de D1 va provoquer sa dégradation par les FtsH protéases, qui sont localisées au niveau des marges des grana et des lamelles stromatiques et sont activées par la déphosphorylation de la protéine D1. La dégradation de D1 débute au niveau du résidu thréonine (Thr) situé dans la région N-terminale, donnant naissance à des fragments de 23 et 9 kDa (25) (Figure 1.16).

De plus, la réduction prolongée de Q_A , suite à un stress lumineux, peut bloquer le transfert d'électrons et favoriser ainsi la recombinaison avec le $P680^+$, ce qui peut générer la forme triplet excitée ($^3Chl^*$). Cette forme est capable d'interagir avec l' O_2 pour donner l'oxygène singulet (1O_2). Ce dernier est connu comme étant un élément clé dans le mécanisme de dégradation de la protéine D1 (25).

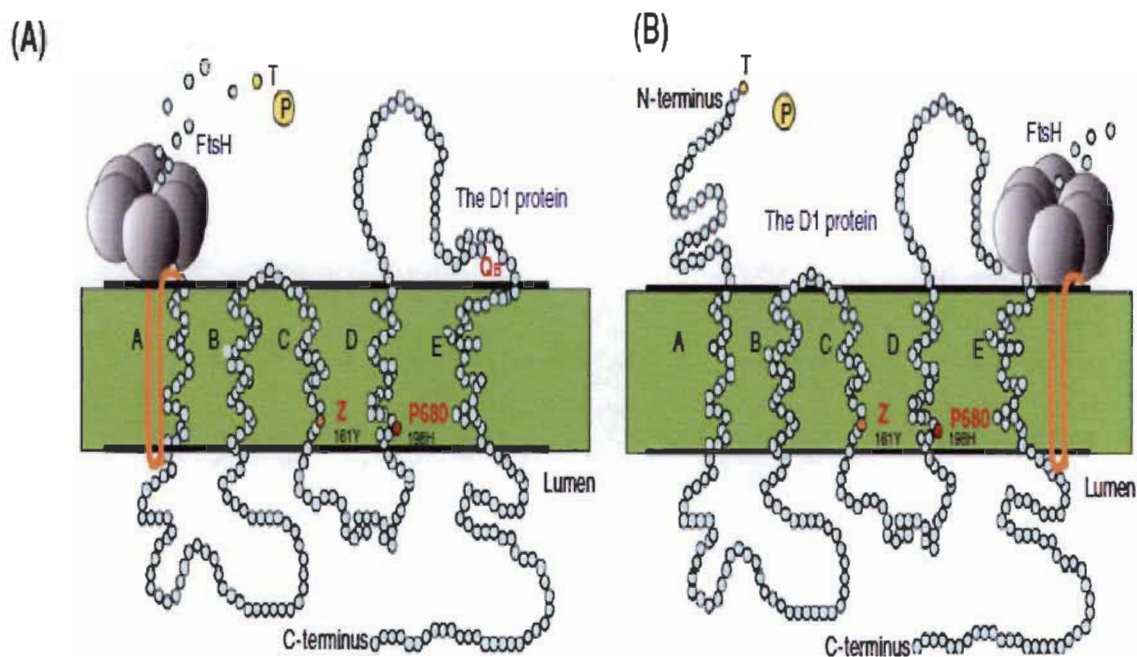


Figure 1.16 : (A) Dégradation de la protéine D1 par la FtsH. Le résidu Thréonine de la partie N-terminale subit une phosphorylation après un stress lumineux, puis subit une déphosphorylation par une phosphatase (P), ainsi commence la dégradation de la protéine D1 à partir de la partie N-terminale. (B) clivage de la protéine D1 au niveau de la boucle DE par la FtsH (Tiré de la référence 25).

– Photoinhibition déclenchée au niveau du côté donneur :

Il a été suggéré aussi, que le côté donneur peut contribuer à la synthèse des radicaux suite à son inactivation provoquée par la photoinhibition (Figure 1.17). En effet, le dysfonctionnement du CEO limite la réduction de Tyz Z^+ et P680^+ et par la suite augmente la concentration de ces radicaux, qui peuvent occasionner des dommages aux niveaux des protéines du PSII, telles que la protéine D1 et la PsbO (25,38,45,46).

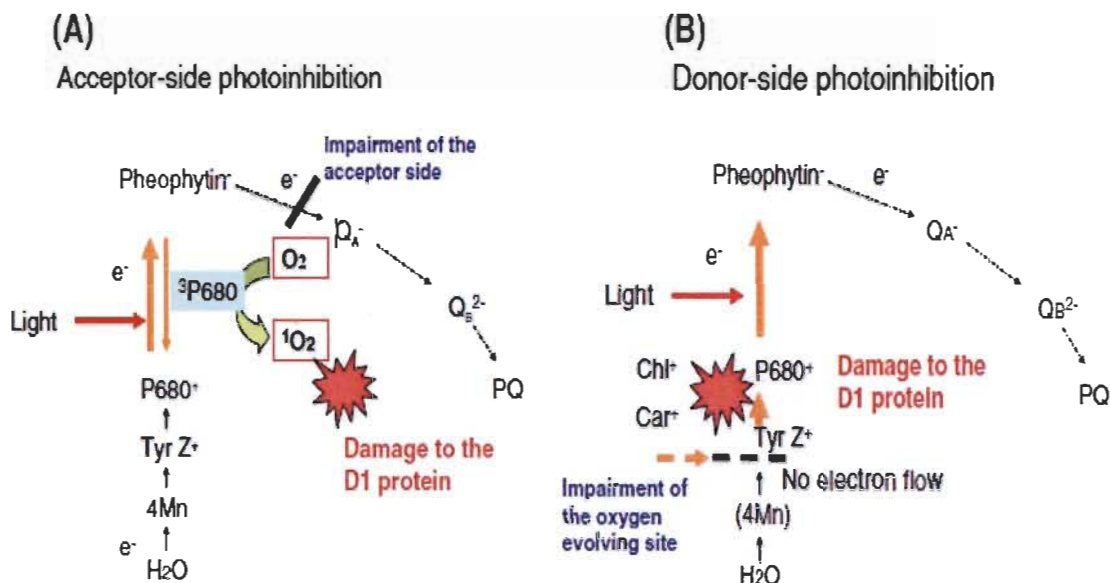


Figure 1.17 : Mécanismes de photoinhibition: (A) photoinhibition générée par le côté accepteur. (B) photoinhibition générée par le côté donneur (Tiré de la référence 25).

Le processus de photoinhibition peut aussi être déclenché *in vitro* dans des échantillons de thylakoïdes éclairés par une forte lumière (24). Dans ce cas, la photoinhibition sera irréversible faute de mécanismes de réparation perdus lors de l'isolation des thylakoïdes.

1.1.9 Mécanismes de photoprotection

Pour limiter les dommages causés par la photoinhibition tout en optimisant l'utilisation de l'énergie lumineuse, la plante doit posséder une gamme de mécanismes lui permettant de bien s'adapter aux changements de son environnement. Parmi ces mécanismes on peut citer :

1.1.9.1 Mouvement des feuilles et des chloroplastes

En réponse à la forte intensité lumineuse, certaines plantes changent l'orientation du plan du limbe foliaire de manière parallèle à la direction des rayons lumineux

incidents, afin d'éviter l'excès de lumière. En plus, dans les cellules de mésophylle, les chloroplastes tendent à se regrouper sur les faces latérales des cellules en orientant leur axe parallèlement à la direction des rayons incidents (Figure 1.18).

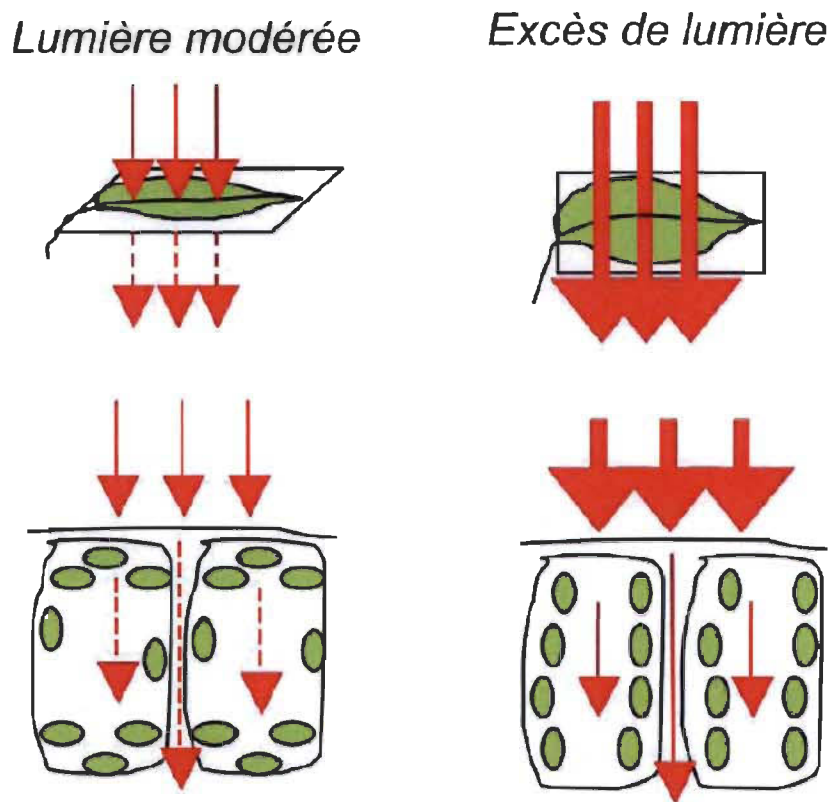


Figure 1.18 : Mouvements des feuilles et des chloroplastes en réponse à un stress lumineux.

1.1.9.2 Adaptation de l'appareil photosynthétique

Les mécanismes de régulation de l'appareil photosynthétique, suite à une forte luminosité, affectent généralement la balance entre les différentes voies de dissipation de l'excitation (fluorescence, photochimie et chaleur). Dans la plupart des cas, la fluorescence et la photochimie seront réduites au profit de la dissipation thermique, on parle alors de "quenching" non photochimique (NPQ) de la fluorescence.

Le NPQ peut être divisé en trois catégories : le "quenching" de haute énergie (qE), comprenant entre autre le cycle des xanthophylles, le "quenching" dû à la transition d'états (qT), et le "quenching" dû à la photoinhibition (qI).

– *Le cycle des xanthophylles (qE) :*

Le cycle des xanthophylles constitue un mécanisme biochimique qui permet la dissipation, sous forme de chaleur, de l'excès d'énergie lumineuse reçue par la plante. Les xanthophylles impliquées dans ce processus sont associées à l'antenne LHCII du PSII. Ce mécanisme est engendré par un faible pH dans le lumen, suite à une activité accrue du PSII, entraînant une protonation des LHCII et une activation d'une déépoxydase, capable de convertir la violaxanthine des LHCII en zeaxanthine, induisant un changement de conformation des antennes. La conséquence est alors une augmentation de la dissipation thermique de l'énergie absorbée (47).

– *La transition d'états (qT) :*

La migration de l'antenne LHCII du PSII vers le PSI conduit à une transition entre un état 1 (LHCII au PSII) et un état 2 (LHCII au PSI). Cette migration permet une redistribution de l'énergie lumineuse entre les deux photosystèmes et une réduction de la capture des photons au niveau du PSII. Elle est engendrée par la forte réduction du pool de PQ, qui active les protéines kinases entraînant la phosphorylation des LHCII. La forme phosphorylée perd alors son affinité pour le PSII et s'en détache pour migrer vers le PSI (état 2). Le retour des LHCII vers le PSII (l'état 1) est initié par l'activation des phosphatases suite à l'oxydation du pool de PQ (48) (Figure 1.19).

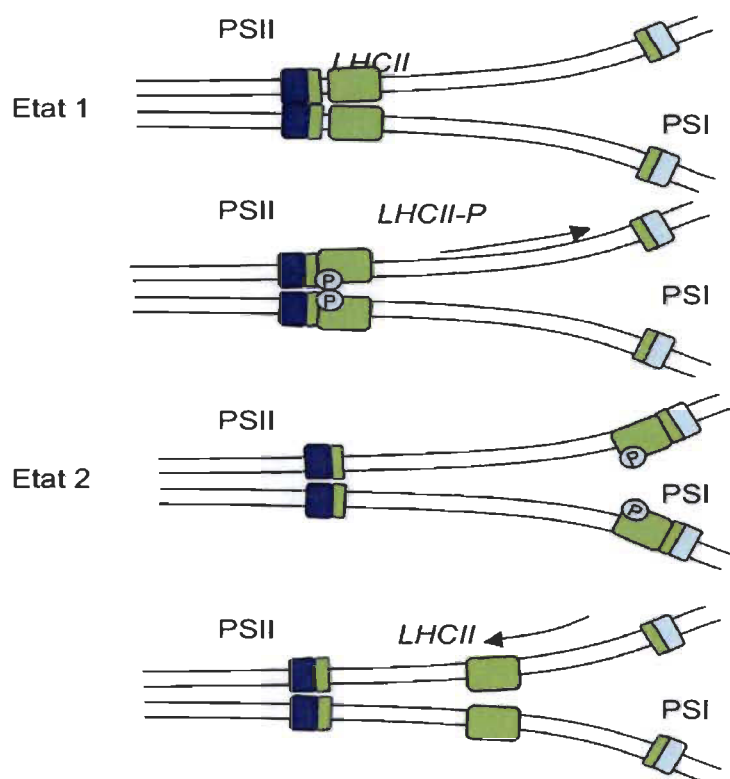


Figure 1.19 : Migration des monomères phosphorylés des LHCII du PSII des zones granaires vers les régions non empilées. Etat 1 : LHCII non phosphorylé, associé au PSII. Etat 2 : LHCII phosphorylé associé au PSI.

- "Quenching" dû à la photoinhibition (qI) :

Dans le cas d'une exposition persistante à un fort éclairage, les FAO engendrées entraînent des dommages importants : les Chls peuvent être dégradées de même que des protéines tant du PSII que du PSI, entraînant une baisse de fluorescence. Ce type d'atténuation de fluorescence est le "quenching" de photoinhibition.

Dans la majorité des cas, la photoinhibition est réversible grâce à un système complexe permettant à la plante de resynthétiser les protéines nécessaires au fonctionnement de l'appareil photosynthétique, essentiellement la protéine D1. En effet, le non empilement des thylakoïdes, causé par le stress lumineux, peut avoir un rôle

important dans le turnover de la protéine D1. Cette modification de la membrane de thylakoïdes peut faciliter la migration des PSII endommagés, du granum vers le granum margine et les lamelles stromatiques, où ils seront en contact avec la phosphatase et la FtsH protéase indispensables pour la dégradation et le turnover de la protéine D1 (24). Cette migration s'avère difficile au niveau des thylakoïdes empilés où les protéines localisées de part et d'autre des thylakoïdes adjacents interagissent en formant des structures entassées de thylakoïdes qui limitent la fluidité des PSII endommagés (Figure 1.20).

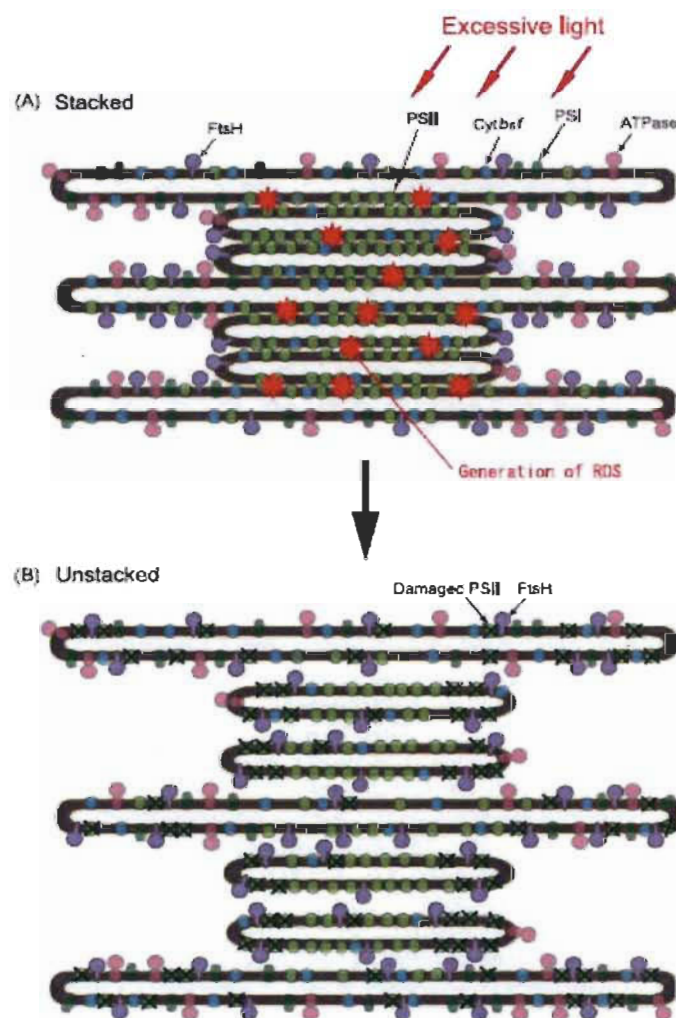


Figure 1.20 : (A) Endommagement des PSII par les FAO, suite à un stress lumineux. (B) Transformation de la membrane des thylakoïdes, induite par la forte luminosité, facilitant la migration des PSII endommagés vers les margines et les lamelles stromatiques (Tiré de la référence 49).

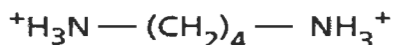
1.1.9.3 Augmentation de la concentration de polyamines

Pour faire face à différents stress abiotiques, notamment la photoinhibition, la plante met en place tout un système d'adaptation lui permettant de protéger son appareil photosynthétique. En parallèle avec les modes de régulation énumérés ci-dessus, l'augmentation de la concentration de polyamines endogènes a été observée chez les plantes en réponse au stress lumineux. En effet, une augmentation de l'ordre de 900 % de spermidine (SPD) a été signalée dans les chloroplastes de tabac exposés à l'irradiation UV-B (50). Cette augmentation a suggéré un rôle important de polyamines endogènes dans la réponse des plantes au stress lumineux.

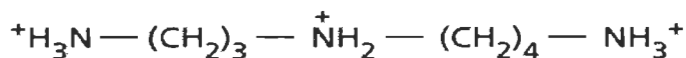
1.2 Les polyamines endogènes

1.2.1 Généralités

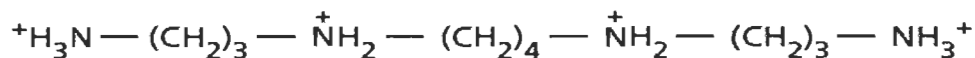
Les polyamines endogènes, telles que la spermine (SPM), la SPD et la putrescine (PUT) sont des composés organiques de faible poids moléculaire, présents dans la majorité des cellules vivantes, qu'elles soient eucaryotes ou procaryotes. Elles sont des amines aliphatiques très solubles dans l'eau et sont complètement protonées (chargées positivement) au pH physiologique, avec un pK de l'ordre de 10 (Figure 1.21).



Putrescine



Spermidine



Spermine

Figure 1.21 : Structure de polyamines endogènes.

La caractéristique prédominante des polyamines c'est le fait qu'elles ont des charges positives distribuées le long de la chaîne aliphatique, cela leur permet d'interagir spécifiquement avec les composés biologiques chargés négativement. En plus, les groupements méthylènes de polyamines peuvent participer à des interactions hydrophobes. Ainsi, les polyamines peuvent se retrouver sous trois formes différentes dans les organismes vivants : (I) sous forme libre comme cation; (II) sous forme conjuguée avec des petites molécules comme les acides phénoliques; (III) sous forme liée avec des macromolécules chargées négativement comme les acides nucléiques, les phospholipides et les protéines (51). Il a été suggéré que l'énergie de liaison va en décroissant de la SPM à la PUT. En plus, pour différents processus biologiques, la SPM était la plus active comparée aux autres polyamines (52).

1.2.2 Biosynthèse des polyamines

Les voies de biosynthèse de polyamines sont conservées dans les différents organismes vivants (53). La phase de synthèse consiste à la formation de la PUT en premier, puis la SPD enfin la SPM via l'action des enzymes spécifiques. Plusieurs espèces animales et végétales peuvent synthétiser la PUT suite à la décarboxylation de l'ornithine par l'ornithine décarboxylase (ODC). Les deux autres polyamines dérivent de la PUT par fixation successive de un et deux groupes aminopropyles sous l'action d'aminopropyl-transférases appelées respectivement spermidine et spermine synthase. Le groupement aminopropyle provient de la décarboxylation d'une molécule de S-adenosyl-méthionine (SAM) produite à partir de l'acide aminé méthionine, réactions catalysées successivement par les enzymes méthionine adénosyl-transférase (MAT) et S-adenosyl-méthionine décarboxylase (SAMDC) (54). La synthèse de SPD et de SPM est donc conditionnée par la disponibilité en méthionine, précurseur de la SAM par condensation avec l'ATP en présence d'ions Mg^{2+} .

Chez les plantes, la PUT est également synthétisée via l'agmatine qui est produite par la décarboxylation de l'arginine par l'arginine décarboxylase (ADC) (55) (Figure 1.22).

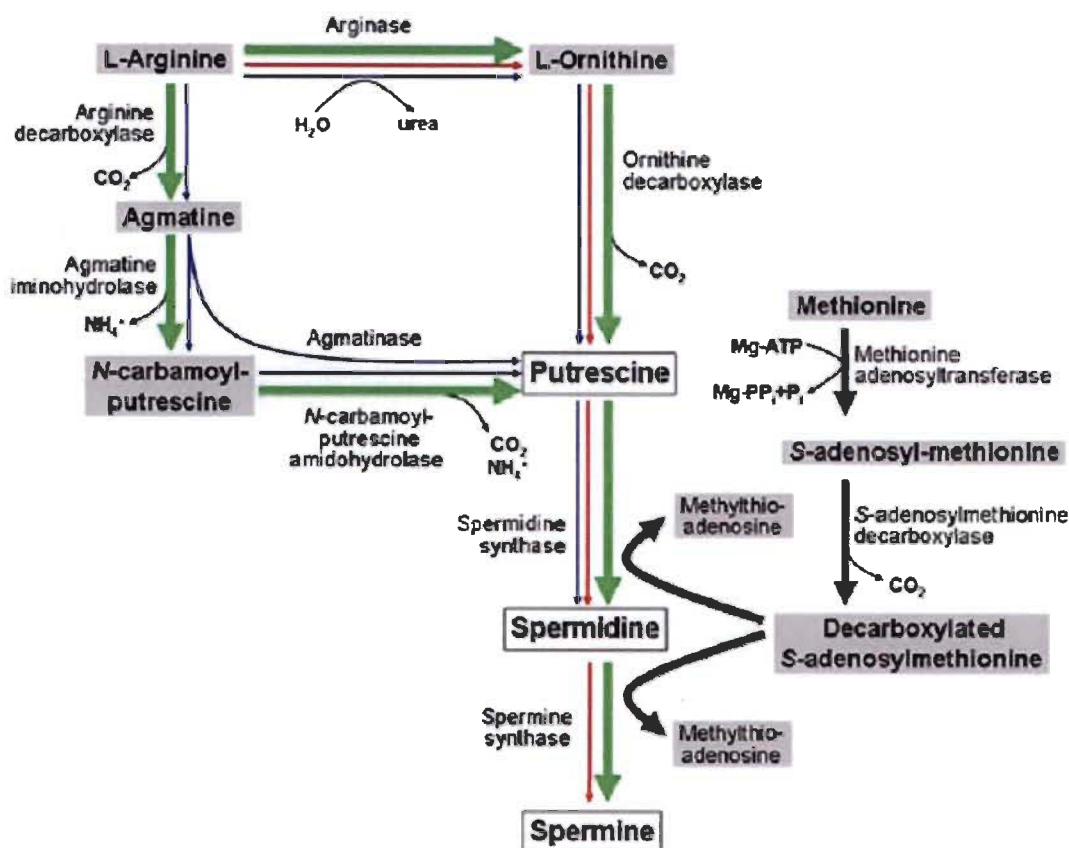


Figure 1.22 : Voies de biosynthèse de polyamines au sein des plantes, des animaux et des bactéries indiquées par des flèches vertes, bleues et rouges respectivement (Tiré de la référence 55).

1.2.3 Interconversions de polyamines

Les polyamines peuvent être métabolisées en plusieurs dérivés par l'action de différentes oxydases et acétyl-transférases, permettant leurs interconversions. Ces réactions consistent à recycler la SPM et la SPD en SPD et PUT respectivement, par un processus en deux temps : (I) ces composés sont tout d'abord acétylés en N^1 -acétyl-spermine/spermidine, réaction catalysée par l'enzyme spermidine/spermine N^1 -acétyl-transférase (SSAT); (II) les SPM/SPD acétylées sont ensuite transformées en SPD et PUT respectivement, par l'intermédiaire de l'enzyme polyamine-oxydase (PAO). Ces réactions sont accompagnées par la libération de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peut déclencher un stress oxydatif dans le cas d'une production excessive et d'aldéhyde

(3-acétamidopropanal) (56). La molécule d'aldéhyde est transformée en β -alanine par l'action des enzymes aldéhyde déshydrogénase et N-acétyl- β -alanine déacétylase (57).

1.2.4 Catabolisme de polyamines

Le catabolisme terminal de polyamines consiste à oxyder les groupes amines en produisant des dérivés non recyclables en polyamines. La plupart des catabolites terminaux de polyamines sont les produits de désamination oxydative de polyamines et de leurs dérivés acétyl par la diamine-oxydase (DAO). En particulier, la PUT qui est un précurseur de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) sous l'action de la DAO. Le GABA peut être à son tour catabolisé en succinate par une série de réactions enzymatiques (58,59).

Chez les plantes, il existe une autre voie par laquelle les polyamines peuvent être catabolisées. En effet, l'enzyme PAO peut catalyser la conversion de la SPM et de la SPD en N-(3-aminopropyle)-4-aminobutanal et en 4-aminobutanal respectivement, tout en produisant une molécule de H_2O_2 et de 1,3-diaminopropane, qui va être dégradée à son tour en β -alanine (60) (Figure 1.23).

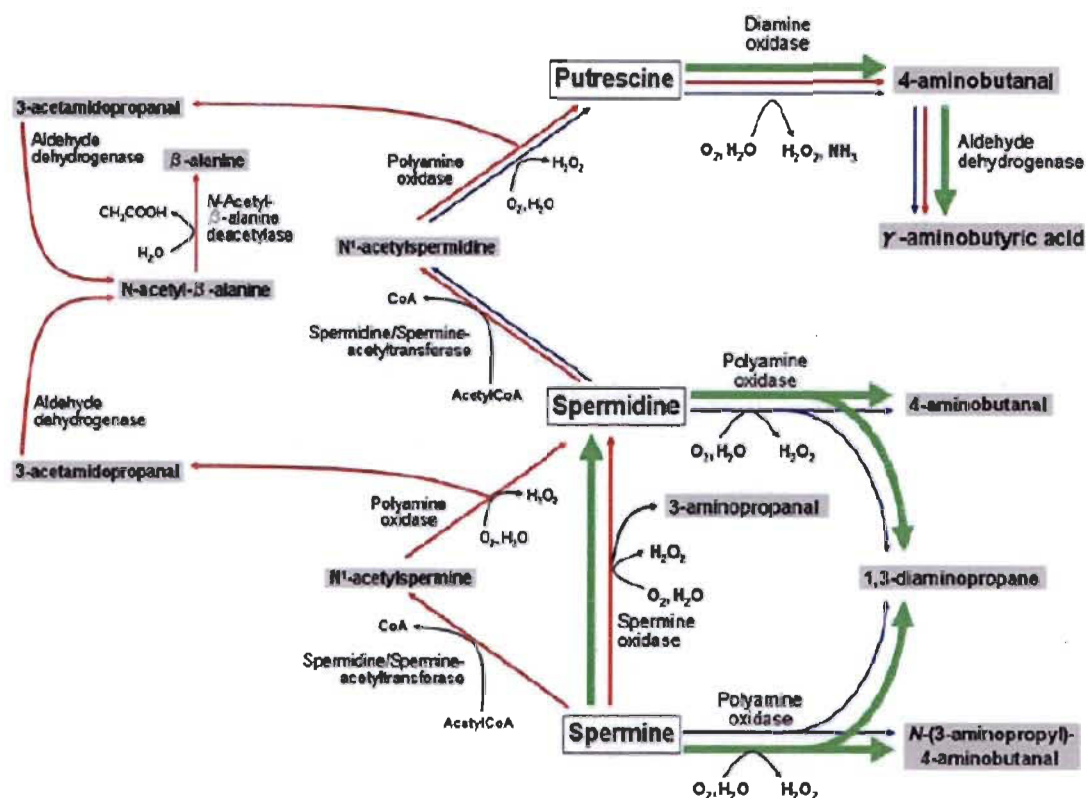


Figure 1.23 : Voies de dégradation de polyamines au sein des plantes, des animaux et des bactéries indiquées par des flèches vertes, bleues et rouges respectivement (Tiré de la référence 55).

1.2.5 Transport de polyamines

Le transport de polyamines à travers les membranes cellulaires (captation et efflux) constitue l'un des moyens importants de régulation du contenu intracellulaire en polyamines (61). Chez les bactéries, le mécanisme de transport a été bien identifié. En effet, trois systèmes ont été décrits chez *Escherichia coli*: deux transporteurs, couplés à une ATPase, spécifiques de la PUT et la SPD et un troisième système spécifique de la SPM et permettant à la fois la captation et la libération de cette molécule (62). Bien que le mécanisme du transport de polyamines chez les cellules animales et végétales n'est pas encore clarifié, un modèle a proposé que les polyamines peuvent être importées à l'intérieur de la cellule animale par des transporteurs non-identifiés capables de séquestrer les polyamines dans des vésicules, par un échange possible de protons, grâce

a un gradient de pH fournit par l'enzyme ATPase vacuolaire (63). Dans la plupart des cellules animales, il existe possiblement deux transporteurs présentant des affinités marquées pour différentes polyamines, un premier pour la PUT, un second pour la SPD et la SPM (64). De plus, des résultats ont suggéré que dans les racines de maïs, la majeure partie de la PUT exogène appliquée est transportée à travers la membrane plasmique par un processus similaire à celui proposé pour les systèmes animaux (65). D'autres résultats ont proposé que les polyamines PUT et SPD ont pu pénétrer à l'intérieur des cellules de carotte moyennant un potentiel transmembranaire, contrôlé par un antiport, qui ajuste la concentration intra et extracellulaire de polyamines (66).

Il a été suggéré aussi que l'agmatine peut être transportée dans des lignées cellulaires humaines par un système actif ATP-dépendant. Ce système de transport est considéré comme un inhibiteur compétitif du transport de polyamines, menant à une baisse de concentration de polyamines intracellulaire (67).

1.2.6 Régulation des niveaux intracellulaires en polyamines

Le contenu intracellulaire en polyamines est la résultante de la régulation simultanée de leurs mécanismes de biosynthèse, de catabolisme, de capture et d'élimination. Les concentrations intracellulaires de polyamines varient généralement entre quelques centaines de micromolaires à quelques millimolaires. Dans le cas d'un niveau plus faible, la croissance cellulaire peut être affectée, alors que des concentrations plus élevées peuvent induire la mort cellulaire programmée (apoptose) déclenchée par la production excessive de H_2O_2 . Il a été confirmé que le contenu intracellulaire est contrôlé par trois enzymes indispensables dans le métabolisme de polyamines, à savoir : l'ODC, la SAMDC et la SSTA (55,58,68).

– *Ornithine décarboxylase (ODC) :*

L'ODC est l'élément clé de la régulation de polyamines, puisqu'elle contrôle leur niveau intracellulaire. Elle est une enzyme à phosphate de pyridoxal, composée d'un homodimère, avec deux sites actifs formés des acides aminés appartenant aux deux sous unités (69). Elle est activée fortement en réponse à plusieurs facteurs de croissance, d'acides aminés tels que la glutamine ou encore du stress hypotonique (52). Cependant, le temps de demi-vie de cette enzyme est de l'ordre de dix minutes, contrairement à la plupart des enzymes animales dont le temps de demi-vie peut atteindre quelques jours (54). En plus, son activité est étroitement contrôlée au niveau de la transcription de son gène, de la traduction et de la dégradation de son ARNm et enfin de son catabolisme (52,69). Lorsque les niveaux de polyamines augmentent considérablement, la protéine ornithine antizyme (AZ) forme un complexe avec l'enzyme ODC, ce qui inhibe l'activité de cette dernière dans un premier temps et stimule sa dégradation par le protéasome 26S dans un second temps (70,71). L'AZ va être à son tour dégradée par l'inhibiteur d'antizyme (AZIN) (Figure 1.24).

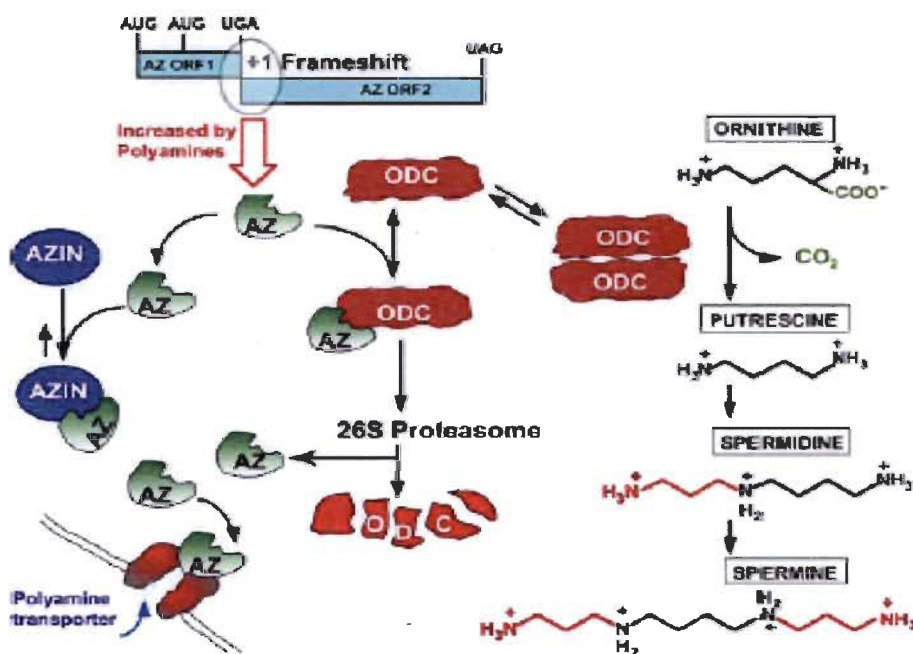


Figure 1.24 : Modalités de régulation de l'enzyme ODC. AZ : inhibiteur de l'ODC, AZIN : inhibiteur de l'antizyme (Tiré de la référence 69).

- *S*-adénosylmethionine décarboxylase (SAMDC) :

L'enzyme SAMDC est impliquée aussi dans la régulation de la concentration intracellulaire de polyamines. Elle est initialement synthétisée sous forme de proenzyme avant de subir une modification post-traductionnelle pour devenir fonctionnelle (72). Cette modification ainsi que l'activité de l'enzyme sont positivement corrélées avec la PUT. En effet, une forte concentration de PUT augmente l'activité de la SAMDC indispensable à l'enzyme spermidine synthase (73). Au niveau traductionnel, l'enzyme est régulée aussi en fonction de la concentration cellulaire de polyamines. Le transcrit du gène de la SAMDC contient une petite séquence codante ouverte en amont du cadre de lecture principal (uORF) produisant l'hexapeptide MAGDIS. Chez les plantes, la séquence uORF contient deux uORFs relativement conservées entre les espèces. La première uORFs (appelée tiny uORFs) est capable d'induire la traduction du cadre de lecture principal dans des conditions de faibles concentrations de polyamines, alors que la deuxième uORFs (appelée petite uORFs) est responsable de la répression de la traduction de ce même cadre dans le cas d'une forte concentration de polyamines (74) (Figure 1.25).

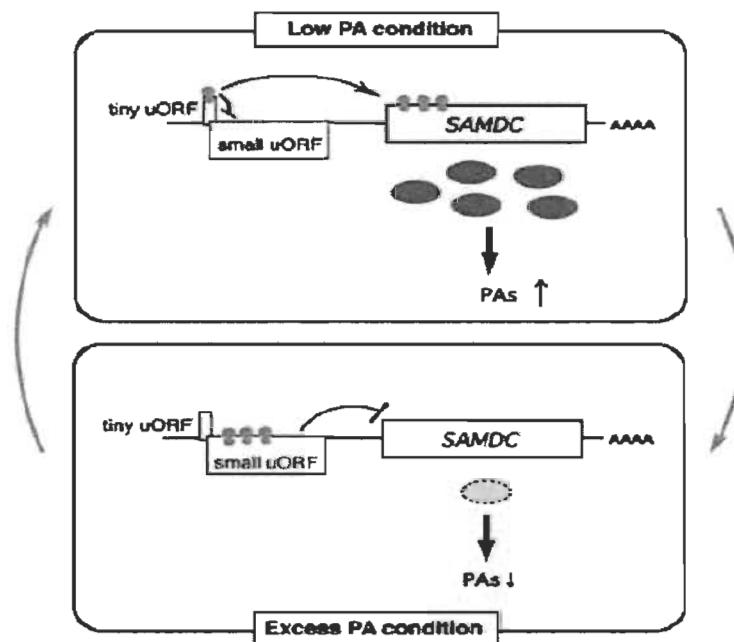


Figure 1.25 : Régulation de l'enzyme SAMDC chez les plantes (Tiré de la référence 74).

- *Spermidine/spermine N¹-acétyl-transférase (SSAT) :*

La SSAT est l'enzyme indispensable pour le processus d'interconversion et dégradation de polyamines. En effet, l'augmentation du contenu intracellulaire en SPM/SPD entraîne une induction de la SSAT, favorisant l'acétylation de polyamines. Cette acétylation permet la neutralisation des charges positives de polyamines à leurs extrémités amino-terminales, diminuant par la suite leur caractère cationique et affectant leur affinité pour les macromolécules biologiques. Les polyamines acétylées seront ensuite dégradées par la PAO (75). Ce mécanisme permet de limiter les effets néfastes d'une accumulation excessive de polyamines.

1.2.7 Polyamines et cycle cellulaire

Il a été suggéré que les polyamines peuvent jouer plusieurs rôles dans la régulation des processus cellulaires, tels que la croissance, la différenciation et la mort cellulaire (75). En effet, les polyamines peuvent réguler la dégradation des protéines cyclines durant le cycle cellulaire. Cette étape est indispensable pour l'activité des kinases cycline-dépendantes (CDKs), enzymes clés dans le processus de croissance cellulaire (68). Des études ont montré que l'inhibition des enzymes responsables de la biosynthèse de polyamines peut provoquer un ralentissement ou une inhibition complète de la croissance cellulaire à diverses phases du cycle. Cependant, l'ajout de polyamines exogènes permet toutefois de limiter l'inhibition de la croissance cellulaire induite par les différents inhibiteurs enzymatiques (68,76). En plus, la réduction de la concentration intracellulaire en polyamines peut entraîner l'augmentation d'expression du gène p53, codant pour la protéine p53. Cette protéine est connue comme un facteur de transcription de plusieurs gènes impliqués dans l'inhibition de la croissance cellulaire (77).

Il a été suggéré aussi que l'augmentation de l'activité de l'ODC et par la suite la concentration de polyamines stimule la réplication de l'ADN, tandis que la dégradation de polyamines par l'enzyme SSAT est nécessaire pour la mitose cellulaire (75).

1.2.8 Polyamines et stress abiotiques

La signification physiologique de l'accumulation de polyamines dans les cellules végétales, en réponse aux différents stress biotiques et abiotiques, a attiré une attention considérable. En effet, plusieurs auteurs ont suggéré que les polyamines peuvent jouer un rôle protecteur contre différents stress abiotiques, tels que la sécheresse, la carence minérale, la présence des métaux lourds dans le sol, l'augmentation de la concentration des polluants atmosphériques et la photoinhibition (78-80). Toutes ces conditions de stress énumérées sont accompagnées par un stress de nature oxydatif et une augmentation de la concentration intracellulaire de polyamines, ce qui a incité certains chercheurs à proposer un rôle antioxydant aux polyamines. En effet, les polyamines peuvent bloquer la propagation des FAO par un système de piégeage de radicaux, dû au pouvoir de liaison ionique de polyamines (81). Il a été suggéré aussi que les polyamines sont impliquées dans l'inhibition de la peroxydation des lipides membranaires, et dans l'inhibition des réactions oxydatives catalysées par des métaux (81-83). En plus, le catabolisme de polyamines est accompagné par la libération du H_2O_2 , qui est une molécule de signalisation impliquée dans le mécanisme antioxydatif des plantes. Cependant, la production excessive de cette molécule peut engendrer un stress oxydatif (79).

Il a été observé que les plantes tolérantes à certains stress ont généralement une grande capacité de déclencher la biosynthèse de polyamines comparées aux plantes sensibles. Par exemple, les cultivars du tabac tolérants au stress provoqué par l'ozone ont la capacité d'accumuler les polyamines dans leurs tissus, spécialement la PUT, alors que le niveau intracellulaire de polyamines dans les cultivars sensibles reste inchangeable (84). En plus, la mesure de la concentration intracellulaire de polyamines chez des cultivars du riz tolérants au stress salin a montré des niveaux élevés de SPM et SPD, alors que chez les cultivars sensibles, seule la concentration de PUT a augmenté (85,86). De même, des analyses faites sur des disques foliaires du blé traités par le cadmium ont montré un niveau élevé de PUT suivi par une forte activité des enzymes ADC et ODC (87). Il a été suggéré ainsi que les plantes tolérantes surexpriment

les gènes impliqués dans la biosynthèse de polyamines en réponse aux différents stress (88,89). Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana* les deux gènes ADC1 et ADC2, qui codent pour l'enzyme ADC, sont fortement induits en présence d'un stress abiotique. En effet, l'expression du gène ADC2 a augmenté considérablement en réponse au stress salin et au manque d'ion K^+ (90). Cependant, l'expression du gène ADC1 a été induite par le stress du froid (91). En plus, la transcription du gène codant pour la spermine synthase a augmenté en réponse à la déshydratation, alors que le gène codant pour la SAMDC a été stimulé par le stress du froid (90,92).

Les approches moléculaires visant la surexpression des gènes de biosynthèse de polyamines ont amélioré également les mécanismes de défense chez certaines plantes sensibles (93,94). Cependant, la croissance et le développement de certaines de ces plantes mutantes ont été affectés (90). Des cultivars du riz transgéniques, capables de surexprimer les gènes impliqués dans la biosynthèse de SPM et SPD, ont manifesté une grande tolérance vis-à-vis à la sécheresse comparés aux témoins (93). De même, des lignées du tabac transgéniques, surexprimant les gènes codant pour la PUT et la SPM, ont montré une grande résistance contre le stress salin (95). En parallèle avec les approches moléculaires, l'ajout de polyamines exogènes aux plantes sensibles peut aussi améliorer la réponse des plantes face à différents stress. Par exemple, l'application exogène de la SPM sur des cultivars d'*Arabidopsis* mutants, incapables de synthétiser la SPM, a protégé la plante contre la sécheresse (96). De même, l'apport exogène de SPD sur des cultivars d'orges sensibles au stress salin a limité l'inhibition causée par ce stress. Ce résultat a permis aux auteurs de suggérer que la transformation de la PUT endogène en SPD et SPM et le maintien d'un niveau élevé de ces polyamines sont nécessaires afin de mieux protéger les plantes contre le stress salin (97).

1.2.8.1 Polyamines et protection de l'appareil photosynthétique

Plusieurs études ont suggéré que l'accumulation de polyamines dans les chloroplastes des plantes supérieures, en réponse aux stress abiotiques, joue un rôle important dans la protection de l'appareil photosynthétique et le maintien de son

activité (50,79,98). En effet, les polyamines sont réputées pour stabiliser les structures protéiques de la membrane de thylakoïdes durant les conditions de stress. D'ailleurs, elles sont retrouvées en association avec la membrane de thylakoïdes, tout particulièrement au niveau du complexe antennaire LHCII. Il est connu que la partie exposée au stroma des antennes LHCII est chargée négativement. Cette propriété favorise l'interaction électrostatique avec les charges positives de polyamines (99). En plus, les polyamines peuvent s'associer d'une manière covalente avec les antennes LHCII, en présence de l'enzyme transglutaminase qui catalyse cette incorporation (100). Cette association est variable en fonction des conditions de stress. En effet, sous une forte concentration de CO₂, la conjugaison entre la PUT et l'antenne LHCII augmente considérablement (101). Alors que, l'irradiation UV-B augmente l'association LHCII-SPM (102). De plus, la basse température peut entraîner une faible affinité entre les polyamines et les antennes LHCII (103). D'une façon générale, la réponse de l'appareil photosynthétique aux différents stress abiotiques est contrôlée par des changements qui touchent le complexe LHCII-polyamines, spécialement la PUT (103). Il a été montré que la présence de PUT influe sur la taille des antennes LHCII (102,103). Une baisse de concentration de PUT conjuguée à l'antenne LHCII favorise l'augmentation de la taille des antennes. Ce changement structural au niveau de la membrane de thylakoïdes peut entraîner l'augmentation de la dissipation thermique de l'excitation et par conséquent la chute du rendement photosynthétique. Cependant, l'augmentation de la forme conjuguée de PUT-LHCII, observée en présence d'une forte concentration de CO₂, peut provoquer la diminution de la taille des antennes LHCII, ce qui augmente l'efficacité du transfert de l'excitation et par la suite améliore le rendement photosynthétique (101). La relation entre le niveau intracellulaire de polyamines et la taille des antennes LHCII suggère que les polyamines peuvent réguler le processus d'adaptation de l'appareil photosynthétique durant un stress donné (84).

De plus, l'application de polyamines exogène peut limiter les dommages subis par l'appareil photosynthétique durant les conditions de stress. Par exemple, le prétraitement des feuilles du blé par la SPD exogène a amélioré le niveau de transcription des gènes codant pour les protéines D1, D2 et LHCII affecté durant le stress hydrique (104). De

même, l'addition de SPD exogène sur des feuilles d'avoine a retardé la dégradation des protéines D1 et D2 durant le stress hydrique (105). Il s'est avéré que l'ajout de SPD exogène peut augmenter le niveau endogène de SPD dans les conditions *in vivo*. Cette augmentation permet le maintien d'intégrité de la membrane de thylakoïdes, ce qui favorise le bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique (106).

D'autres études ont montré que l'application de SPM exogène est capable de protéger l'appareil photosynthétique contre le stress salin. Ces études ont suggéré que l'apport exogène de SPM induit l'augmentation de la concentration endogène de SPM *in vivo* et par conséquent l'augmentation de la connectivité entre les oligomères de LHCII (PSII α), ce qui permet une utilisation efficace de l'énergie lumineuse (107,108). De même, l'ajout de 1 mM de SPM sur des plantules de pois, exposées à l'effet toxique de l'atrazine (herbicide), a permis une augmentation de 30 à 35 % de surface foliaire et de 50 à 60 % de contenu en Chls par rapport aux plantules traitées seulement par l'atrazine (109).

En plus de son affinité avec les antennes LHCII, la PUT a montré plus d'efficacité à stimuler la production d'ATP comparée aux autres polyamines. En effet, l'addition de PUT exogène sur des disques foliaires du tabac a augmenté la synthèse d'ATP d'environ 70 % (110). En conclusion, les polyamines sont principalement impliquées dans la bioénergétique de la photosynthèse dans la mesure où la PUT stimule la synthèse d'ATP alors que la SPD et la SPM activent la photoprotection (107). Cependant, l'application d'une forte concentration de polyamines peut endommager l'appareil photosynthétique suite à l'altération du CEO et la perturbation du transfert d'électrons dans le PSII (111,112).

1.3 Problématiques et objectifs du projet

Bien que le rôle de polyamines dans la croissance et la différenciation cellulaire chez les plantes soit connu, plusieurs de leurs mécanismes moléculaires sont toujours

inconnus, à savoir les mécanismes de transport intracellulaire ainsi que la régulation des processus cataboliques aux niveaux transcriptionnel et traductionnel (79,113).

De même, l'implication de polyamines dans les mécanismes de défense des plantes contre les différents stress abiotiques a été reconnue ces dernières années. En effet, plusieurs études ont montré que la concentration de polyamines endogènes augmente considérablement en réponse aux différents stress (78-80). Cependant, les modes d'action sur le plan moléculaire restent encore controversés. Il a été suggéré que les polyamines peuvent jouer un rôle antioxydant, en inhibant la production des FAO et empêchant leur propagation. Toutefois, l'excès de polyamines peut engendrer un stress oxydatif en produisant un surplus de H_2O_2 lors de leur catabolisme (79,81).

L'accumulation de polyamines a été observée aussi dans les chloroplastes des plantes supérieures en réponse aux conditions de stress, ce qui a incité les chercheurs à attribuer un rôle protecteur aux polyamines, sans pour autant connaître les mécanismes précis de cette protection. En parallèle avec leur pouvoir antioxydant, les polyamines sont réputées pour stabiliser les protéines chloroplastiques durant les conditions de stress. Cependant, le rôle de chaque polyamine endogène dans la protection de l'appareil photosynthétique contre les différents stress abiotiques reste ambigu. Notre hypothèse stipule que le nombre de charges positives de polyamines pourrait définir le rôle de chaque polyamine en réponse à un stress donné. Par exemple, la SPM avec quatre charges positives (la plus hydrophile) serait la plus appropriée à protéger les protéines extrinsèques et les parties hydrophiles des protéines intrinsèques des photosystèmes durant les conditions de stress. Tandis que, la PUT avec deux charges positives (la plus hydrophobe) serait la plus adéquate à traverser la membrane de thylakoïdes et stimuler la synthèse d'ATP en réponse à un stress donné.

Pour confirmer notre hypothèse, une étude comparative entre trois amines, à savoir la SPM, la PUT et la méthylamine (MET), sera réalisée dans des conditions *in vitro*, moyennant plusieurs analyses spectroscopiques et biochimiques. L'objectif principal de

cette étude consiste à vérifier l'effet des charges positives de polyamines sur l'activité photosynthétique. Pour y parvenir, deux étapes seront envisagées :

(I) Déterminer les sites et les modes d'action de la MET et son effet sur l'activité photosynthétique. Pour cela, des échantillons de thylakoïdes et de fragments membranaires enrichies en PSII seront traités par diverses concentrations de MET afin de provoquer l'inhibition de l'activité photosynthétique et suggérer par la suite les sites et les modes d'action potentiels de la MET. Après, les résultats des différentes analyses spectroscopiques et biochimiques seront comparés avec les résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire avec les polyamines SPM et PUT dans les mêmes conditions expérimentales.

(II) Élucider le rôle de charges positives des amines dans la protection de l'appareil photosynthétique contre la photoinhibition. Pour y parvenir, des échantillons de thylakoïdes seront traités par 1 mM de MET, PUT ou SPM puis éclairés par une forte lumière durant 30 min. Par la suite, l'activité des photosystèmes (I et II) sera estimée par différentes mesures spectroscopiques, à savoir la thermoluminescence, l'induction de fluorescence, la fluorescence à 77 K et la photooxydation du P700.

Pourquoi le choix sur la MET?

La MET représente un modèle pour bien élucider l'effet du nombre de charges positives de polyamines, étant donné que la SPM présente quatre charges positives, la PUT deux charges positives et la MET une seule charge positive. De plus, la différence du point de vue de la taille moléculaire entre les amines SPM, PUT et MET ayant respectivement 10, 4 et 1 atomes de carbones peut contribuer à mieux comprendre les modes d'action de polyamines. Enfin, puisque toutes les polyamines endogènes partagent la caractéristique d'avoir deux charges positives (une à chaque extrémité), il serait logique de penser à tester une amine avec une seule charge positive sur une extrémité, afin de déterminer l'importance de ce paramètre dans le mode d'action de polyamines.

CHAPITRE II

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1 Matériel utilisé

Les amines, à savoir la PUT, la SPM et la MET ont été obtenues commercialement (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) et utilisées sans purification supplémentaire.

Les feuilles d'épinards (*Spinacea oleracea* L.) ont été achetées commercialement et utilisées immédiatement pour l'isolation des fractions membranaires photosynthétiques.

2.2 Isolation des membranes de thylakoïdes

Les membranes de thylakoïdes ont été isolées à partir des feuilles d'épinards selon la méthode décrite par la référence (114). Après isolation, le culot contenant les thylakoïdes a été suspendu dans un tampon contenant 250 mM sorbitol, 20 mM Tricine-KOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 10 mM NaCl et 5 mM MgCl₂. La concentration de Chl a été déterminée selon la méthode décrite par la référence (115).

2.3 Isolation des fractions membranaires enrichies en PSII

Les fractions membranaires des PSII ont été isolées à partir de la membrane de thylakoïdes selon la méthode décrite par la référence (116) avec des modifications mineures. Après une incubation de 90 min à la noirceur à 4°C, le Triton X-100 a été ajouté à la solution de thylakoïdes avec une concentration finale en Chl de 1 mg/mL. Cette solution a été incubée 1 min à la noirceur puis centrifugée pendant 4 min à 600g. Le surnageant a été centrifugé pendant 15 min à 35300g puis le culot a été suspendu dans un tampon contenant 20 mM Mes-NaOH (pH 6.2), 15 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ et

400 mM de sucrose. Par la suite, l'homogénat a été centrifugé pendant 4 min à 4960g. Le surnageant obtenu a été centrifugé pendant 15 min à 35300g puis le culot a été suspendu dans le même tampon. Le nouveau homogénat contenant la préparation de PSII a été centrifugé pendant 15 min à 35300g puis le culot a été suspendu dans le même tampon. Enfin, la concentration de Chl a été déterminée selon la méthode décrite par la référence (115).

2.4 Mesure du dégagement d'oxygène standard

Dans le but d'estimer l'activité du PSII, le taux du dégagement d'O₂ a été mesuré en utilisant l'électrode d'O₂ de Clark (Hansatech instruments). Cette technique consiste à appliquer une différence de potentiel de 0.7 V entre une cathode en platine et une anode en argent. Sous l'influence de cette tension, l'O₂ dissous dans la solution de KCl est ionisé en hydroxyle au contact de la cathode suivant cette réaction :



Les électrons qui ont servi à la consommation d'O₂ proviennent de l'oxydation de l'argent selon la réaction suivante :



Il en résulte un courant très faible, proportionnel à la concentration en O₂ du milieu dans lequel baigne l'électrode. C'est ce courant qui est amplifié et mesuré. Un thermorégulateur est connecté à la chambre d'électrode afin de limiter la variabilité de la température, qui peut fausser les mesures (Figure 2.1).



Figure 2.1 : Électrode d'oxygène de Clark

L'échantillon de thylakoïdes (25 μg de Chl/mL) a été éclairé par une lumière blanche, saturante et continue (2000 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) à 24°C. Le milieu d'analyse de 1 mL contenait 20 mM MES-NaOH (pH 6.2), 1 mM NaCl, 0.5 mM MgCl_2 , 0.35 mM DCBQ (2.5-dichlorobenzoquinone, ajouté à la solution comme accepteur d'électrons) et la concentration spécifiée d'amine. Une fois éclairée, la machine photosynthétique va libérer l' O_2 qui va diffuser à travers la membrane de téflon (perméable à l' O_2) où il va être intercepté par l'électrode.

2.5 Taux du dégagement d'oxygène induit par flash

Le taux du dégagement d' O_2 induit par flash a été mesuré pour des membranes de thylkoïdes à 24°C, grâce à un équipement construit dans notre laboratoire. Cet instrument est composé d'une électrode de mesure de taux d' O_2 couplé à un système d'illumination par flash. Le courant électrique mesuré dans l'électrode est proportionnel à la concentration d' O_2 dans l'échantillon testé, lequel courant est amplifié, puis transmis par un convertisseur analogique-numérique à un ordinateur pour l'enregistrement des données à une fréquence de 0.5 kHz. Le compartiment supérieur de l'électrode (où est située l'anode d'argent) a été rempli d'un tampon électrolyte composé de 400 mM de sucrose, 40 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 10 mM NaCl et 5 mM MgCl_2 , tandis que l'échantillon de thylakoïdes (déposé sur la cathode en platine) a été suspendu

P700⁺ par la voie linéaire et de 50 μ M de méthyl-viologène (accepteur d'électrons) pour empêcher la recombinaison entre le P700⁺ et le côté accepteur du PSI.



Figure 2.2 : Fluorimètre PAM-101.

2.10 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les spectres de FTIR ont été mesurés avec un spectrophotomètre (Nicolet Impact 420) équipé d'un détecteur de type DTGS (deuterated triglycine sulfate) et d'un séparateur de faisceau de KBr utilisant des fenêtres de AgBr. Les spectres ont été acquis à partir de films hydratés, créés par une incubation de deux heures à la température pièce de 100 μ L des solutions des échantillons sur des fenêtres de KBr. Les spectres comptent 40 balayages acquis avec une résolution de 2 cm^{-1} recueillant des données entre 4000-600 cm^{-1} ; les spectres ont été mesurés pour le PSII non traité (1 mg Chl/mL) et pour chacun des complexes formés avec l'amine (5, 7 et 15 mM). Les spectres de différences [(PSII + amine) - (PSII)] ont été générés en utilisant la bande du Triton à 1285 cm^{-1} comme référence, puisque cette bande ne subit pas de décalage ou de variation d'intensité lors de la formation d'un complexe et s'annule lors de la soustraction spectrale, comme mentionné par la référence (118). Les spectres de différences ont été utilisés dans le but d'analyser la nature de l'interaction amine-protéine au niveau des

différents modes de liaison peptidiques C=O et C-N, aussi bien qu'au niveau de la complexation amine-lipide et amine-tyrosine.

2.10.1 Analyse de la structure secondaire par FTIR

L'analyse de la structure secondaire du PSII et de ses complexes avec les amines a été effectuée sur la base de la procédure publiée par les références (119-121). La structure secondaire du PSII est déterminée selon la forme de la bande amide I localisée vers $1650\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$. L'autodéconvolution par transformée de Fourier et l'augmentation de la résolution de la dérivée seconde ont été appliquées pour augmenter la résolution du spectre dans la région de $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. L'amélioration de la résolution a été réalisée en utilisant une ligne de forme Lorentzienne pour l'autodéconvolution et une ligne de forme Gaussienne pour l'apodisation. La quantification des aires des différentes composantes de la bande amide I, révélées par autodéconvolution et dérivée seconde, a été possible grâce à un ajustement de courbe itératif du moindre carré utilisé pour adapter la forme de la ligne Lorentzienne au spectre entre $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. L'analyse de cet ajustement a été faite en utilisant le programme Spectra Calc (Galactic Industries Corporation, Salem, New Hampshire, USA). Avant de faire l'ajustement à la courbe, une ligne de base passant à travers les coordonnées à 1700 et 1600 cm^{-1} a été soustraite. La ligne de base a ensuite été modifiée par un ajustement de courbe itératif du moindre carré, permettant l'ajustement d'une ligne de base horizontale utilisée comme paramètre additionnel afin d'obtenir le meilleur ajustement de courbe possible. La courbe résultante a été analysée en assignant chaque bande Lorentzienne à une structure secondaire selon la fréquence de son maximum : feuillet β parallèle ($1614\text{-}1637\text{ cm}^{-1}$), structure désordonnée ou pelote statistique ($1638\text{-}1648\text{ cm}^{-1}$), hélice α ($1654\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$), coude β ($1670\text{-}1678\text{ cm}^{-1}$) et feuillet β antiparallèle ($1680\text{-}1691\text{ cm}^{-1}$). L'aire de chacune des bandes assignées à une conformation donnée ont été additionnées et ensuite divisées individuellement par l'aire totale; le nombre obtenu correspond à la proportion de la protéine dans cette conformation. Les attributions de structure secondaire sont consistantes avec les valeurs déterminées théoriquement selon la référence (120).

2.11 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate (SDS) a été utilisée afin de déterminer les protéines relâchées par les amines. Pour cela les préparations de PSII ont été incubées 1 min à l'obscurité à température pièce puis centrifugées durant 5 min à 12400 rpm dans une microcentrifugeuse à eppendorf. Les culots ont été lavés deux fois dans 400 mM de sucrose et 20 mM MES-NaOH (pH 6.2) avant d'être utilisés pour l'analyse des protéines. Le surnageant a également été centrifugé à 12400 rpm pendant 5 minutes pour enlever les fragments membranaires restants. L'extraction par Tris-alkali des protéines de 17, 23 et 33 kDa a été effectuée selon la méthode proposée par la référence (122). Le surnageant des fractions membranaires de PSII traités avec les amines ou par Tris-alkali ont été concentrés contre le sucrose en utilisant des membranes Spectra/Por munies de pores moléculaires (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) avant l'analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'électrophorèse a été appliquée à température pièce en utilisant des gels miniatures en galette (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) contenant 13 % d'acrylamide et 6 M d'urée. Les gels ont été colorés avec le bleu brillant de Coomassie et le contenu en protéines a été analysé avec le système Gel-Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

CHAPITRE III

INTERACTION OF METHYLAMINE WITH EXTRINSIC AND INTRINSIC SUBUNITS OF PHOTOSYSTEM II

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2009 dans le journal, *Biochimica et Biophysica Acta*: Hamdani, S., Carpentier, R., Interaction of methylamine with extrinsic and intrinsic subunits of photosystem II, vol. 1787: 1223-1229.

Résumé

Le but spécifique de cette étude est de déterminer les sites d'action potentiels de la MET et son effet sur l'activité photosynthétique. Pour y parvenir, nous avons étudié l'interaction *in vitro* de la MET avec la membrane de thylakoïdes isolée. Une faible concentration de MET, ajoutée à l'échantillon, a perturbé significativement l'oxydation de l'eau et l'avancement des états S. Ces effets enregistrés ont été accompagnés par des modifications aux niveaux de l'induction de la fluorescence et la thermoluminescence, indiquant une perturbation du transfert d'électrons entre les différents cofacteurs du PSII, en particulier entre Y_z et $P680^+$. Dans le cas d'une forte concentration de MET (> 10 mM), les protéines extrinsèques du CEO ont été arrachées et le transfert d'énergie entre les antennes du PSII et le CR a été perturbé. À la lumière de ces résultats, nous avons suggéré que la MET est capable d'interagir avec les protéines extrinsèques, en inhibant l'activité du CEO et par la suite le transfert d'électrons entre les différents cofacteurs du PSII. De plus, en absence des protéines extrinsèques, la Met a montré aussi une capacité de pénétration à travers la membrane de thylakoïdes et d'interaction avec les protéines intrinsèques telles que les antennes CP47 et CP43, ce qui a conduit à une augmentation du F_0 .

Interaction of Methylamine with extrinsic and intrinsic subunits of Photosystem II

Saber Hamdani and Robert Carpentier*

*Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières,
Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7;*

Running title: Inhibitory action of Methylamine on Photosystem II

*Author for correspondence (E-mail: Robert.Carpentier@uqtr.ca. Phone: 1-819-376-5011 ext.3300. Fax: +1-819-376-5057)

†This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Key words: photosystem II; oxygen-evolving complex; Y_Z; CP47; methylamine

¹Abbreviations: Chl, chlorophyll; FI, chlorophyll fluorescence induction; F_o , basal level of chlorophyll fluorescence; F_m , maximal level of chlorophyll fluorescence; F_v , variable chlorophyll fluorescence; OEC, oxygen-evolving complex; P680, primary electron donor of photosystem II; Pheo, pheophytin; PS, photosystem; PQ, plastoquinone; Q_A and Q_B, primary and secondary quinone acceptors of photosystem II; RC, reaction center; LHC, light harvesting complex; TL, thermoluminescence; T_m , temperature maximum of thermoluminescence emission; D1 and D2, heterodimeric core of PSII; Y_D, the redox active tyrosine 160 of D2 protein; Y_Z, the redox active tyrosine 161 of D1 protein; CP47 and CP43, proximal antenna proteins; MSP, manganese stabilizing protein.

Abstract

The interaction of methylamine with chloroplasts photosystem II (PSII) was studied in isolated thylakoid membranes. Low concentration of methylamine (mM range) was shown to affect water oxidation and the advancement of the S-states. Modified kinetics of chlorophyll fluorescence rise and thermoluminescence in the presence of methylamine indicated that the electron transfer was affected at both sides of PSII, and in particular the electron transfer between Y_Z and $P680^+$. As the concentration of methylamine was raised above 10 mM, the extrinsic polypeptides associated with the oxygen evolving complex were lost and energy transfer between PSII antenna complexes and reaction centers was impaired. It was concluded that methylamine is able to affect both extrinsic and intrinsic subunits of PSII even at the lowest concentrations used where the extrinsic polypeptides of the OEC are still associated with the luminal side of the photosystem. As methylamine concentration increases, the extrinsic polypeptides are lost and the interaction with intrinsic domains is amplified resulting in an increased F_0 .

Introduction

In bacteria, plants and animals, polyamines are required for cell proliferation and growth. Through their binding to biological molecules, polyamines are considered to take part in the regulation of basic plant physiological processes such as cell division and morphogenesis, as well as responses to environmental and stress conditions [1,2]. Several studies have reported the interaction of polyamines with proteins of photosystem II (PSII¹) leading to the inhibition of electron transport activity [3–5]. This photosystem is responsible for water oxidation and the consequent oxygen evolution in oxygenic photosynthetic prokaryotes and chloroplasts of higher plants [6]. PSII contains multiple intrinsic and extrinsic subunits. A tetranuclear manganese (Mn) cluster and cofactors such as Ca^{2+} and Cl^- form the oxygen-evolving complex (OEC) together with three extrinsic polypeptides of 17, 23 and 33 kDa [7]. The OEC is associated with the intrinsic proteins D1 and D2, which cross the thylakoid membrane and form the heterodimeric core of PSII that binds the redox-active cofactors involved in electron transfer [8]. Among the pigment-protein complexes in charge of light-harvesting, CP47 and CP43 compose the inner light-harvesting complex of PSII. Both subunits have been revealed to interact with the oxygen-evolving site and participate in the stabilization of electron transfer reactions [9].

The photochemical events in PSII are initiated by the capture of incident photons by the antenna complexes. The energy absorbed is quickly transferred to the photochemical reaction centers (RC) where the excited singlet state of the special chlorophyll (Chl) a, P680, reduces a pheophytin (Pheo) molecule. Stabilization of the charge separated state occurs with the electron transfer from Pheo^- to Q_A , the primary plastoquinone of PSII, forming $\text{P680}^+\text{Q}_\text{A}^-$. The P680^+ radical oxidizes tyrosine Y_Z (Tyrosine 161 of D1). The latter is re-reduced by electrons originating from the Mn cluster. At this site, water oxidation is performed through the so-called S-state cycle, $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3 \rightarrow (\text{S}_4) \rightarrow \text{S}_0$, requiring four successive quanta of excitation. Concurrent with the release of dioxygen from water, the S_4 -state decays to the S_0 -state

after the 4th step. At the acceptor side, Q_A^- reduces the secondary plastoquinone, Q_B , in a two step process leading to the formation of plastoquinol (PQH_2).

Polyamines such as spermine and spermidine were shown to strongly interact with the luminal side of PSII causing the release of the three extrinsic polypeptides of 17, 23 and 33 kDa associated with the OEC. The release of the 33 kDa in the presence of polyamines did not affect the content of the Mn cluster but the S-state advancement of the OEC was compromised together with the following electron transfer reactions [5]. Similarly, diamines such as putrescine and cadaverine interacted with PSII proteins (H-bonding) through polypeptides C=O groups with no major perturbation of protein secondary structure. This was sufficient to strongly inhibit oxygen-evolution and electron transfer was inadequate to reduce the quinone acceptors of PSII thus decreasing the maximum fluorescence yield [4].

The PSII subunits CP47, D1 and D2 contain reactive groups, which covalently bind monoamines such as methylamine and buthylamine [10–12]. Monoamines could represent an interesting simplified model to better understand the action of polyamines. Several monoamines such as Tris, ammonia, methylamine and buthylamine are known to reversibly inhibit water oxidation in PSII and affect the distribution of higher S-states of the OEC [13]. Ammonia induced inhibition involved binding at two sites: the chloride site in a competitive manner and the substrate water binding site at or near the tetranuclear Mn cluster [13,14]. However, it has been reported that amines larger than ammonia do not bind to the Mn cluster directly because of steric reasons [13].

In order to examine how methylamine can interact with extrinsic and intrinsic components of PSII, we have analyzed the interaction of this monoamine with isolated thylakoid membranes. Water oxidation and the advancement of the S-states, the kinetics of Chl fluorescence rise, and the electron transfer at both sides of PSII were affected. We concluded from the experimental data that inhibition of the OEC and the following electron transfer resulted from interaction of methylamine with both extrinsic and intrinsic subunits of the photosystem.

Materials and methods

Materials

Methylamine (40 wt.% solution in water) was purchased from Sigma Chemical Co. (St-Louise, MO) and used as supplied.

Thylakoid membrane preparation

Thylakoid membranes were isolated from fresh market spinach (*Spinacia oleracea* L.) as described elsewhere [15] and kept in the dark. Chl concentration was calculated following the procedure outlined in Porra et al. [16].

Isolation of PSII submembrane fractions

PSII submembrane fractions were isolated from thylakoid membranes according to Berthold [17] with minor modifications. After incubation for 90 min in the dark at ice-cold temperature, Triton X-100 was added while gently shaking for 1 min to obtain a final concentration of 2.35% (v/v) and 1 mg Chl mL⁻¹. This solution was incubated 1 min in the dark and centrifuged for 4 min at 600 X g. The supernatants were further centrifuged for 15 min at 35300 X g. The resulting pellet was suspended in a buffer containing 20 mM Mes-NaOH (pH 6.2), 15 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, and 400 mM sucrose. The homogenate was centrifuged for 4 min at 4960 X g. The supernatants were centrifuged for 15 min at 35300 X g and the pellets were suspended in the same buffer. This new homogenate was centrifuged for 15 min at 35300 X g. Finally the pellet was suspended in the same buffer and the Chl content was determined as described previously [16].

Polyacrylamide gel electrophoresis

To determine the polypeptides released by methylamine, PSII preparations ($100\ \mu\text{g Chl mL}^{-1}$) were incubated for 1 min at room temperature in the presence of methylamine and harvested immediately by a 5-min centrifugation (12400 rpm) in an Eppendorf microcentrifuge. The pellets were washed twice in 20 mM Mes-NaOH (pH 6.2) and used for polypeptide analysis. The first supernatants were further centrifuged (12400 rpm for 5 min) to remove remaining membrane fragments. Tris-alkali extraction of the 17, 23 and 33 kDa polypeptides was carried out following the standard procedure of Nakatani [18]. The supernatants of the methylamine or Tris-alkali treated PSII submembrane fractions were concentrated against sucrose using Spectra/Por Molecularporous membranes (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) before analysis by polyacrylamide gel electrophoresis. The latter was performed at room temperature using miniature slab gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) containing 13% acrylamide and 6 M urea. The gels were stained with Coomassie brilliant blue and the polypeptide content was analyzed with the Gel-Doc 2000 system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Oxygen evolution

Flash-induced oxygen evolution was measured in the thylakoid membranes at 22°C using a laboratory built instrument. A complete description of the oxygen electrode system can be found elsewhere [19]. The electrode consists of two compartments separated by a cellophane membrane. The silver anode is filled by an electrolyte buffer containing 400 mM sucrose, 40 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 10 mM NaCl, and 5 mM MgCl_2 . Thylakoid membranes deposited in the cathode chamber were diluted to $200\ \mu\text{g Chl mL}^{-1}$ in a medium containing 400 mM sucrose, 40 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 and the specified concentrations of methylamine in the total volume of 100 μl . After a 3-min incubation, the sample was illuminated by a train of 12 saturating (4J) single turn-over flashes (10 μs). The quantitative estimation of photosynthetic oxygen production and the S-state transitions

were measured using an analytical solution for the fitting of experimental data as described previously [20].

Chl fluorescence induction (FI)

FI measurements were performed at room temperature using the Plant Efficiency Analyser (Hanasatech, King' Lynn, Norfolk, UK). The assay medium contained 250 mM sorbitol, 20 mM Tricine KOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 25 $\mu\text{g Chl mL}^{-1}$ and the specified concentrations of methylamine (1 min incubation). Samples were excited with saturating red actinic light (655 nm and an intensity of 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by light emitting diodes. As the fluorescence signal during the first 40 μs is ascribed to artifacts due to delay in response time of the instrument, these data were not included in the analyses of FI traces. The signal at 40 μs was taken as F_0 , the initial fluorescence. Variable fluorescence, F_v (the difference between F_0 and the maximal fluorescence, F_m , in dark adapted samples), was used to calculate the F_v/F_m and F_v/F_0 ratios.

Thermoluminescence (TL)

TL measurements were carried out with a laboratory built instrument. The description of the design and functional aspects are presented elsewhere [21,22]. Thylakoid membranes were diluted to 200 $\mu\text{g Chl mL}^{-1}$ in a medium containing 20 mM Tricine-NaOH (pH 7.8), 400 mM sucrose, 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 and the specified concentrations of methylamine. About 200 μL of the suspension was added to the sample compartment (15 mm diameter) positioned just above the Peltier plate and covered with a Hellma 202-OS disc window. The sample chamber was closed with a holder bearing the light guide connected to the photomultiplier. The sequence of pre-incubation periods and flash illumination of thylakoids is presented below. First, samples were incubated for 120 s at 20°C. Following this step, the temperature was brought down to 2°C within 5-8 s and kept for 60 s. This incubation temperature was selected in order to avoid freezing induced damages to the OEC that may give rise to

artefacts in thylakoid membranes without cryoprotectant [22]. An actinic single turn over saturating white flash of about 1 μs width (setting 10, XE-STC, Walz, Germany) was applied to initiate charge separation in PSII. During the last step, linear warming of samples in total darkness activated the recombination of PSII charge pairs that can be detected by the appearance of emission bands with characteristic temperature optima [21,22].

Flash induced fluorescence

Flash induced Chl fluorescence was measured by a double-modulation fluorometer (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic). Thylakoid membranes were diluted to 25 $\mu\text{g Chl mL}^{-1}$ in a medium containing 250 mM sorbitol, 20 mM Tricine KOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 and the specified concentrations of methylamine. After 1 min incubation, an actinic flash of about 50 μs duration was applied and fluorescence measurements were taken each 1 μs during the flash.

Results

The influence of methylamine (added as free methylamine) on the OEC of thylakoid membranes isolated from spinach is shown in (Fig. 1A). Samples were illuminated by a group of saturating single turn-over flashes. A periodicity of four in the yield of oxygen evolution is observed in relation to the advancement of the S-states (S_n , where $n = 0, 1, 2, 3, 4$) of the OEC [23]. Oxygen evolution after each flash strongly declined in the presence of methylamine and the oscillation pattern was also modified. In the presence of up to 10 mM of methylamine, the largest oxygen evolution yield was observed after the third flash. This maximum was progressively shifted toward the fourth flash as the concentration of methylamine was raised (see Fig. 1A, 16 mM). This shift was accompanied by an increase in the percent of misses (zero-step advance) and a decrease in the percent of hits (one-step advance) (table 1). Figure 1B shows that methylamine inhibits oxygen evolution in the mM range and about 50% of the activity

was lost with 10 mM. Similar observations could be made with PSII submembrane fractions using a Clark-type electrode (result not shown). Inhibition of oxygen evolution by methylamine was previously explained by its interaction with the OEC [11]. In order to establish the site of action of methylamine more precisely, various techniques were used as described below.

Polyacrylamide gel electrophoresis was used to clarify the interaction of methylamine with the extrinsic polypeptides associated with the OEC (Fig. 1C). PSII submembrane fractions were incubated for 1 min with methylamine and then centrifuged to separate the submembrane fractions from free polypeptides. In lane 5 (Fig. 1C) it is shown that incubation for 1 min of the PSII submembrane fractions in the presence of 20 mM methylamine, three polypeptides were depleted at the position that corresponded to the extrinsic polypeptides of 17, 23 and 33 kDa associated with the OEC as compared to the control (lane 2). These polypeptides were recovered in the supernatant of the treated samples (lane 6). This set of polypeptides coincided with the polypeptides released by the incubation of PSII submembrane fractions for 1 min with Tris-alkali (pH 9.2) (lane 7), a treatment known to release the three extrinsic polypeptides of the OEC. At 10 mM, no polypeptide was removed significantly (see lanes 3 and 4). The methylamine concentration that caused polypeptide depletion corresponded to the almost complete inhibition of oxygen evolution observed in thylakoid membranes (Fig. 1B) or in PSII submembrane fractions using a Clark-type electrode (results not shown).

The action of methylamine on Chl fluorescence properties of thylakoid membranes was studied. The results are shown in (Fig. 2). The initial fluorescence level F_0 observed with the reaction center (RC) in an open state was strongly increased with methylamine (Fig. 2A). The increase in F_0 was mainly observed above 15 mM of methylamine, which coincided with a decrease in the maximal PSII photochemical yield, F_v/F_m , where $F_v = F_m - F_0$, (Fig. 2B). The maximal fluorescence F_m , observed with the RC in closed state, was also greatly decreased (data not shown). The decline in F_m corresponded with a decrease in F_v/F_0 observed above 5 mM (Fig. 2C), a parameter that accounts for the simultaneous variations in F_m and F_0 in determinations of the maximum quantum yield

of PSII [24,25]. Thus, the drop of F_v/F_0 observed above 5 mM methylamine and of F_v/F_m above 15 mM was correlated, respectively, with the pattern of inhibition of oxygen evolution and the depletion of the three extrinsic polypeptides of the OEC (Figs. 1B and 1C).

In order to have more information on FI properties of methylamine treated samples, we analyzed the O-J-I-P induction traces. These traces display the progressive reduction of the plastoquinones located at the acceptor side of PSII with three main phases corresponding to OJ, JI and IP [26–28] (Fig. 3A). Figure 3A shows the progressive damping of FI upon treatment with methylamine suggesting that the OEC failed to provide electrons for PSII to reduce the quinone acceptors. Addition of calcium chloride (CaCl_2 , up to 10 mM) or the artificial electron donor diphenylcarbazide (2-5 mM) could not restore the kinetics of Chl fluorescence in methylamine-treated samples (data not shown), despite the lost of the extrinsic polypeptides associated with the OEC and the dysfunctional Mn cluster.

Thermoluminescence was used to determine the effect of methylamine on charge recombination processes in PSII. Figure 3B shows the TL glow curves supplied with a linear increase in temperature from 2°C to 62°C at the rate of 0.5°C/s following a 1- μ s single turn-over white flash. The amplitude of TL signal attains its maximum (T_m) at 37°C in control thylakoid samples (Fig. 3B trace 1). This major TL emission band corresponds to the temperature optimum of the B-band (30°C-40°C) attributable to charge recombination between the oxidized Mn-cluster predominantly in the S_2 state and Q_B^- [29]. This band was progressively decreased as the concentration of methylamine was raised (Fig. 3B traces 2-4). About 50% of the TL intensity was abolished with 7-10 mM methylamine (see inset of Fig. 3B). Above 15 mM methylamine the B-band was totally suppressed (Fig. 3B trace 5). The effect of methylamine on the intensity of the B-band was also accompanied by a small shift of the T_m toward lower temperatures that reached 2.5 °C at 10 mM methylamine. Probably, the strong inhibitory effect of methylamine on charge recombination was due to the loss of the donor side partners for the radiative recombination pathways.

Figure 3C shows the flash-induced Chl fluorescence measured at a 1- μ s time resolution simultaneously with the duration of an actinic saturating flash of about 50 μ s. In this experiment, the electron transfer between Q_A^- and Q_B^- is not observed because the time needed for this transfer is greater than 50 μ s [30]. The shape of this fluorescence rise contains information concerning the fluorescence when RCs are opened (F_0) and the variable fluorescence during the flash ($F_{v\ 50\ \mu s}$) pertaining to electron transport between P680 and Q_A . These traces display the progressive reduction of Q_A , which was slowed as the concentration of methylamine increased (Fig. 3C, traces 1-5). Indeed, with 20 mM methylamine $F_{v\ 50\ \mu s}$ was diminished by approximately 25%. In parallel with this loss, F_0 was increased by nearly 70% compared to control (Fig. 3C traces 4). At 30 mM methylamine, F_0 was augmented by about 100% compared to control while $F_{v\ 50\ \mu s}$ was completely abolished (Fig. 3C traces 5).

Discussion

In the present study, we have shown that methylamine is able to affect PSII activity in the mM range of concentration and within only a few-min incubation. Indeed, below 10 mM, up to 50% of the oxygen yield was lost. At these methylamine concentrations, no significant perturbation in the advancement of the S-states of the Mn cluster was observed in the OECs that were still unaffected by the inhibitor (Figs. 1A and 1B). Similar results were obtained with several anions or Lewis bases [31,32]. This inhibitory effect is explained by the interaction between methylamine and the OEC at or near to the Mn cluster. The loss of oxygen yield was accompanied by the inhibition of electron transfer to the acceptor side that was reflected in a decreased F_v/F_0 ratio. Hence, the incapacity of PSII to reduce adequately the plastoquinone pool resulted in seriously damped fluorescence induction kinetics (Fig. 3A).

In the early work of Sandusky and Yocum [13,14], it was concluded that methylamine competed with chloride for the binding site but was not directly ligated to the Mn cluster. It was proposed that this site was accessible only to ammonia. In addition, a previous study had shown that bulkier amines such as Tris, AEPD, and

methylamine did not affect the S_2 state multiline EPR signal [33]. In contrast, another report [34] suggested that methylamine competed with substrate water and did not bind to the chloride binding site due to steric effects. Our results indicate that the action of methylamine is more deleterious than simple binding to the chloride site because the addition of calcium chloride had no effect on the degree of inhibition by methylamine.

A recent FTIR study showed that small amines (including ammonia and methylamine) can modify the structural and electronic properties of the Mn cluster [35]. Accordingly, TL measurements revealed a progressive loss of the B-band emission after incubation with raising concentrations of methylamine. This decrease is explained by the strong disruption of the back-flow of electrons from Q_B^- to the S_2/S_3 states of the Mn cluster (Fig. 3B). In parallel, a shift of T_m by about 2.5 °C towards lower temperatures was observed. This shift is opposite to the shift observed in the presence of polyamines [5]. The upshift observed with polyamines was proposed to be due to partial disorganization of the Mn_4Ca complex and stabilization of the S_2 state during an intermediate step of this disorganization [5]. In the present case, such an intermediate step is probably not observed as methylamine may interact further with the donor side of PSII (see below). A decline in T_m in the presence of inhibitors, such as observed here, was previously interpreted by a faster inhibition of the PSII centers having a greater activation energy requirement for charge recombination and thus a higher T_m [22]. This is likely to reflect the heterogeneity in the populations of PSII centers (e.g. spatially segregated in stromal and granal membranes or Q_B non-reducing centers) and their differential sensitivity toward inhibitory effects [36].

During our experiments we have observed that the addition of 5 mM diphenylcarbazide did not restore the slower electron transfer from Y_Z to the PQ pool inhibited by methylamine. Diphenylcarbazide is an efficient electron donor to Y_Z when the OEC is perturbed [37] and 1 mM diphenylcarbazide could indeed restore significantly the photoreduction of the plastoquinone pool in PSII affected by polyamines such as spermine, spermidine [5] or by diamines [4]. The inefficient electron donation by diphenylcarbazide observed in the present study suggests that methylamine

exerts a deeper effect in the OEC compared to polyamines. As the inhibition by methylamine can be overcome by neither calcium chloride nor diphenylcarbazine, methylamine is likely to interact either directly with Y_Z (Tyr 161 of D1) or with amino acids located nearby thus causing a dysfunctional electron transfer from Y_Z to $P680^+$. Specific conformational characteristics are required for the active electron transfer between Y_Z to $P680^+$ as the photooxidation of Y_Z requires the simultaneous proton exchange with His¹⁹⁰ of D1 [38,39]. Perturbation of the OEC, even milder than that observed with methylamine, was shown to disturb this electron transfer reaction [32]. Also, the oxidation of Y_Z is pH-dependent and much slower in Mn-depleted PSII [40,41]. Thus, the binding of methylamine with amino acids at or near the OEC not only affects oxygen evolution but also the direct reduction of $P680^+$.

At 20 mM, methylamine almost totally suppressed the oxygen yield (Figs. 1A and 1B). This inhibition was correlated with the release of the three extrinsic polypeptides of 17, 23 and 33 kDa associated with the OEC (Fig. 1C). The polyamines spermine and spermidine, and several cations such as Ni^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} were also shown to release the extrinsic polypeptides of PSII to various extents [5,32,42,43]. Removal of the two extrinsic polypeptides of 17, 23 kDa decreases the binding affinity of Ca^{2+} and Cl^- for the OEC [44]. These cofactors are essential to maintain the active conformation of the OEC preserving the proper advancement of the S-states [13,45,46]. The other extrinsic polypeptide of 33 kDa is known as the manganese stabilizing protein (MSP). In its absence, two or four Mn ions are released and the oxygen evolving activity is lost [47]. At this concentration of methylamine, we have observed an almost complete loss of the electron transfer from donor side to acceptor side of PSII. This was shown by the drastic decrease in F_v/F_m ratio, damped FI and the totally suppressed TL emission (Figs. 2B, 3A and 3B). The total dysfunction of the OEC above 20 mM methylamine corresponds with the loss of Q_A reduction by the primary electrons observed during the 50 μ s flash-induced fluorescence induction (Fig. 3C). This loss is attributable to the formation of $P680^+$, which is known to occur with the inhibition of electron transfer from Y_Z to $P680^+$ [48] and provides for the fast charge recombination. PSII centers with $P680^+$ are thus characterized by a fluorescence yield close to F_o [49].

Interestingly, after incubation with 20 mM methylamine, a strong raise of F_0 (nearly 70%) was observed compared to the control (Fig. 3A). The increase of F_0 was further confirmed by experiments using flash-induced Chl fluorescence at a 1- μ s resolution (Fig. 3C), which was previously used to provide information regarding the heterogeneity of light harvesting in PSII, with α -centers having large and interconnected antenna systems and β -centers having smaller isolated antenna [50,51]. In our study, the raise of F_0 is suggested to originate from a decreased energy transfer from the antenna complexes to the reaction centers. This idea is supported by an increase in the percent of misses and a decrease in the percent of hits calculated from the yield of flash-induced oxygen evolution (see table 1, Fig. 1A) that were observed in parallel with the rise of F_0 . We propose that the interaction between methylamine and the amino acids of the large hydrophilic loops of the proximal antenna protein of CP47 (and/or CP43) produces a conformational change perturbing the transfer of excitation energy from these complexes to the reaction centers.

In conclusion, methylamine at low concentration (mM range) was shown to affect oxygen evolution and inhibit electron transfer between Y_Z and $P680^+$ (Fig. 4). As the concentration of methylamine was raised, the extrinsic polypeptides of the OEC were lost and energy transfer between PSII antenna complexes and RCs was impaired. These actions indicate that methylamine is able to affect both extrinsic and intrinsic subunits of PSII even at the lowest concentrations used where the extrinsic polypeptides of the OEC are still associated with the luminal side of the photosystem (Fig. 4A). The extrinsic polypeptides are lost at higher methylamine concentration. This facilitates the interaction with the proximal antenna resulting in an increased F_0 (Fig. 4B).

References

- [1] C.W. Tabor, H. Tabor, Polyamines, *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1984) 749–790.
- [2] T.A. Smith, G.R. Best, Polyamines in barley seedlings, *Phytochemistry* 16 (1977) 841–843.
- [3] A. Bograh, Y. Gingras, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, The effects of spermine and spermidine on the structure of photosystem II proteins in relation to inhibition of electron transport, *FEBS Lett.* 402 (1997) 41–44.
- [4] R. Beauchemin, J. Harnois, R. Rouillon, H.A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier, Interaction of polyamines with proteins of photosystem II: cation binding and photosynthetic oxygen evolution, *J. Mol. Struct.* 833 (2007) 169–174.
- [5] R. Beauchemin, A. Gautier, J. Harnois, S. Boisvert, S. Govindachary, R. Carpentier, Spermine and spermidine inhibition of photosystem II: disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from Tyr_Z to P680⁺ and the quinone acceptors Q_A⁻ to Q_B, *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (2007) 905–912.
- [6] E.M. Sproviero, J.A. Gascon, J.P. McEvoy, G.W. Brudvig, V.S. Batista, Quantum mechanics/molecular mechanics study of the catalytic cycle of water splitting in photosystem II, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 3428–3442.
- [7] R.J. Debus, The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution, *Biochim. Biophys. Acta* 1102 (1992) 269–352.
- [8] O. Nanba, K. Satoh, Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 109–112.
- [9] T.M. Bricker, L.K. Frankel, The structure and function of CP47 and CP43 in photosystem II, *Photosynth. Res.* 72 (2002) 131–146.

- [10] L.B. Anderson, A.J.A. Ouellette, Eaton-Rye, M. Maderia, M.J. MacCoss, J.R. Yates, B.A. Barry, Evidence for a post-translational modification, aspartyl aldehyde, in a photosynthetic membrane protein, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 8399–8405.
- [11] A.J.A. Ouellette, L.B. Anderson, B.A. Barry, Amine binding and oxidation at the catalytic site for photosynthetic water oxidation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 2204–2209.
- [12] L.B. Anderson, A.J.A. Ouellette, B.A. Barry, Probing the structure of photosystem II with amines and phenylhydrazine, *Biol. Chem.* 275 (2000) 4920–4927.
- [13] P.O. Sandusky, C.F. Yocum, The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution: factors affecting nucleophilic displacement of chloride from the oxygen-evolving complex, *Biochim. Biophys. Acta* 849 (1986) 85–93.
- [14] P.O. Sandusky, C.F. Yocum, The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution: analysis of the effects of chloride and others anions on amine inhibition of the oxygen-evolving complex, *Biochim. Biophys. Acta* 766 (1984) 603–611.
- [15] D. Joly, C. Bigras, J. Harnois, S. Govindachary, R. Carpentier, Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes, *Photosynth. Res.* 84 (2005) 107–112.
- [16] R.J. Porra, W.A. Thompson, P.E. Kriedemann, Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 975 (1989) 384–394.
- [17] D.A. Berthold, G.T. Babcock, C.F. Yocum, A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes EPR and electron-transport properties, *FEBS Lett.* 134 (1981) 231–234.

- [18] H.Y. Nakatani, Photosynthetic oxygen evolution does not require the participation of polypeptides of 16 and 24 Kilodaltons, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 120 (1984) 299–304.
- [19] Y. Zeinalov, An equipment for investigations of photosynthetic oxygen production reactions, *Bulg. J. Plant Physiol.* 28 (2002) 57–67.
- [20] J. Messinger, G. Seaton, T. Wydrzynski, U. Wacker, G. Renger, S-3 state of the water oxidase in photosystem II, *Biochemistry* 36 (1997) 6862–6873.
- [21] J.M. Ducruet, Chlorophyll thermoluminescence of leaf discs: simple instruments and progress in signal interpretation open the way to new ecophysiological indicators, *J. Exp. Bot.* 54 (2003) 2419–2430.
- [22] A. Gauthier, S. Govindachary, J. Harnois, R. Carpentier, Interaction of N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine with photosystem II as revealed by thermoluminescence: reduction of the higher oxidation states of the Mn cluster and displacement of plastoquinone from the QB niche, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 1547–1556.
- [23] B. Kok, B. Forbush, M. McGloin, Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-I. A linear four step mechanism, *Photochem. Photobiol.* 11 (1970) 457–475.
- [24] F. Babani, H.K. Lichtenthaler, Light-induced and age-dependent development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO₂ assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios, *J. Plant Physiol.* 148 (1996) 555–566.
- [25] S. Govindachary, N.G. Bukhov, D. Joly, R. Carpentier, Photosystem II inhibition by moderate light under low temperature in intact leaves of chilling-sensitive and-tolerant plants, *Physiol. Plant.* 121 (2004) 322–333.
- [26] X.G. Zhu, N.R. Govindjee, D. Bakereric, D.R. Ort, P.L. Stephen, Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each

discrete step of excitation energy and electron transfer associated with photosystem II, *Planta* 223 (2005) 114–133.

[27] P. Pospisil, H. Dau, Chlorophyll fluorescence transients of photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution, *Photosynth. Res.* 65 (2000) 41–52.

[28] S. Boisvert, D. Joly, R. Carpentier, Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics apparent activation energy and origin of each kinetic step, *FEBS J.* 273 (2006) 4770–4777.

[29] P.V. Sane, Thermoluminescence: A technique for probing photosystem II, in: R. Carpentier (Ed.), *Photosynthesis Research Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2004, pp. 229–248.

[30] J. Bowes, A.R. Crofts, C.J. Arntzen, Redox reactions of the reducing side of photosystem II in chloroplasts with altered herbicide binding properties, *Arch. Biochem. Biophys.* 200 (1980) 303–308.

[31] H. Alice, K. R-Allen, T. Rebecca, Effects of azide on the S2 state EPR signals from photosystem II, *Photosynth. Res.* 63 (2000) 35–45.

[32] S. Boisvert, D. Joly, S. Leclerc, S. Govindachary, J. Harnois, R. Carpentier, Inhibition of the oxygen-evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel, *Biometals* 20 (2007) 879–889.

[33] W.F. Beck, G.W. Brudvig, Binding of amines to the O₂-evolving center of photosystem II, *Biochemistry* 25 (1986) 6479–6486.

[34] K. Michael, Methylamine and its effects on the oxygen evolving ability of PSII and the S2-state multiline signal, in: *Cofactors on the donor side of photosystem II investigated with EPR techniques*, These, Berlin, Germany, 2003, pp. 95–106.

- [35] C. Hsiu-An, F. Ya-Wen, W. Chiu-Ming, C. Kuo-An, K. Shyue-Chu, Ammonia-induced structural changes of the oxygen-evolving complex in photosystem II as revealed by light-induced FTIR difference spectroscopy, *Biochemistry* 43 (2004) 10877–10885.
- [36] J. S. Townsend, A. Kanazawa, D.M. Kramer, Measurements of $S_2Q_B^-$ recombination by delayed thermoluminescence reveal heterogeneity in photosystem II energetics, *Phytochemistry* 47 (1998) 641–549.
- [37] L.M. Ghirardi, W.T. Lutton, M. Seibert, Interactions between diphenylcarbazide, zinc, cobalt, and manganese on the oxidizing side of photosystem II, *Biochemistry* 35 (1996) 1820–1828.
- [38] A.M.A. Hays, I.R. Vassiliev, G.H. Golbeck, R.J. Debus, Role of D1-His190 in proton-coupled electron transfer reactions in photosystem II: a chemical complementation study, *Biochemistry* 39 (1998) 11352–11365.
- [39] K.L. Westphal, N.L. Simantiris, R.I. Cukier, G.T. Babcock, Effects of Sr^{2+} -substitution on the reduction rates of Yz in PSII membranes-evidence for concerted hydrogen-atom transfer in oxygen evolution, *Biochemistry* 39 (2000) 16220–16229.
- [40] F. Rappaport, J. Lavergne, Charge recombination and proton transfer in manganese-depleted photosystem II, *Biochemistry* 36 (1997) 15294–15302.
- [41] R. Ahlbrink, M. Haumann, D. Cherepanov, O. Bogershausen, A. Mulikidjanian, W. Junge, Function of tyrosine z in water oxidation by photosystem II: electrostatical promotor instead of hydrogen abstractor, *Biochemistry* 37 (1998) 1131–1142.
- [42] I. Yruea, M. Alfonso, M. Baron, R. Picorela, Copper effect on the protein composition of photosystem II, *Physiol. Plant.* 110 (2000) 551–557.
- [43] M. Bernier, R. Carpentier, The action of mercury on the binding of the extrinsic polypeptides associated with the water oxidizing complex of photosystem II, *FEBS Lett.* 360 (1995) 251–254.

- [44] A. Seidler, The extrinsic polypeptides of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* 1277 (1996) 35–60.
- [45] H.J. V-Gorkom, C.F. Yocum, The calcium and chloride cofactors, in: T.J. Wydrzynski, K. Satoh (Eds.), *Photosystem II: The light-driven water: plastoquinone oxidoreductase*, Springer, Dordrecht, the Netherlands, 2005, pp. 307–327.
- [46] J.S. Vrettos, G.W. Brudvig, Water oxidation chemistry of photosystem II, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 357 (2002) 1395–1405.
- [47] A.J. Wyman, C.F. Yocum, Structure and activity of the photosystem II manganese-stabilizing protein: role of the conserved disulfide bond, *Photosynth. Res.* 85 (2005) 359–372.
- [48] R.D. Britt, Oxygen Evolution, in: D.R. Ort, C.F. Yocum (eds.), *Advances in Photosynthesis: Oxygenic Photosynthesis, The Light Reactions*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 1996, pp. 137–164.
- [49] J. Deprez, A. Dobek, N.E. Geacintov, G. Paillotin, J. Breton, Probing fluorescence induction in chloroplasts on a nanosecond time scale utilizing picosecond laser pulse pairs, *Biochim. Biophys. Acta* 725 (1983) 444–454.
- [50] O. Urban, M. Trtilek, T. Field, L. Nebdal, Single-turnover flashes to saturate Q_A reduction in a leaf were generated by the light-emitting diodes from a double modulation kinetic chlorophyll fluorometer, *Photosynthetica* 37 (1999) 201–207.
- [51] L. Nebdal, M. Trtilek, D. Kaftan, Flash fluorescence induction: a novel method to study regulation of photosystem II, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 48 (1999) 154–157.
- [52] A. Guskov, J. Kern, A. Gabdulkhakov, M. Broser, A. Zouni, W. Saenger, Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 334–342.

- [53] K. Ifuku, T. Nakatsu, H. Kato, F. Sato, Crystal structure of the PsbP protein of photosystem II from *Nicotiana tabacum*, *EMBO Rep.* 5 (2004) 362–367.
- [54] M. Balsera, J.B. Arellano, J.L. Revuelta, J. de las Rivas, J.A. Hermoso, The 1.49 Å resolution crystal structure of PsbQ from photosystem II of *Spinacia oleracea* reveals a PPII structure in the N-terminal region, *J. Mol. Biol.* 350 (2005) 1051–1060.
- [55] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF chimera- a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.

Figure legend

Figure 1

(A) Period-four oscillation of the yield of oxygen evolution in thylakoid membranes using a train of 12 saturating (4J) single turn-over flashes (10 μ s) after a 3-min incubation with various concentrations of methylamine: (1) control; (2) 4 mM; (3) 8 mM; (4) 12 mM; (5) 16 mM; (6) 20 mM. All traces were normalized at the third flash of the control. Assays were carried out in media containing 400 mM sucrose, 40 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 10 mM NaCl, and 5 mM $MgCl_2$. Details are given in Materials and methods. (B) Inhibition of oxygen evolution in thylakoid membranes after 3 min incubation with various concentrations of methylamine. Each point represents the total yield of the first four flashes from the experiment of Fig. 1A given as the percent of oxygen evolution of the untreated sample (100%). (C) Depletion of extrinsic polypeptides in PSII submembrane fractions after 1 min incubation in the presence of methylamine. Lane 1, molecular weight standards; lane 2, control PSII; lane 3, 10 mM methylamine-treated PSII; lane 4, supernatant of 10 mM methylamine-treated PSII; lane 5, 20 mM methylamine-treated PSII; lane 6, supernatant of 20 mM methylamine-treated PSII; lane 7, supernatant of the Tris-alkali-treated PSII. Numbers on the left indicate apparent molecular masses (kDa) of the markers.

Figure 2

Effect of increasing methylamine concentration in thylakoid membranes on the Chl fluorescence parameters (A) F_0 , (B) F_v/F_m , (C) F_v/F_0 . Each point is the average of 3 independent experiments (6-9 assays per point).

Figure 3

(A) Chl fluorescence induction traces of thylakoid membranes treated with various concentrations of methylamine: (1) control; (2) 5 mM; (3) 10 mM; (4) 15 mM; (5) 20 mM; (6) 30 mM. (B) Thermoluminescence glow curves (B-band) from thylakoid

membranes after treatment with different concentrations of methylamine: (1) control; (2) 3 mM; (3) 7 mM; (4) 10 mM; (5) 15 mM. The samples were heated from 2°C to 62°C at a rate of 0.5°C/s. Inset: Relative intensity of the B-band at various methylamine concentrations. (C) Chl fluorescence induction provided by a single saturating flash in the presence of methylamine: (1) control; (2) 5 mM; (3) 10 mM; (4) 20 mM; (5) 30 mM. The arrow indicates the onset of the flash. Fluorescence measurements were taken each 1 μ s during the flash (50 μ s). The points are the average of 3 independent experiments (9 assays per point).

Figure 4

Proposed model of interaction of methylamine with PSII (A) at low concentration (< 20 mM) and (B) at high concentration of methylamine (> 20 mM). Arrows indicate the site of interaction of methylamine. At low concentration, methylamine interacts with extrinsic proteins of the OEC, the Mn₄ cluster, and TyrZ. At high concentration, extrinsic proteins of the OEC are removed. Methylamine interacts with TyrZ and possibly with the hydrophilic loop of CP43 and/or CP47 on the luminal side of PSII. D1 (red), D2 (rose), CP43 (blue), CP47 (light blue), and PsbO (cyan) subunit structures from *Thermosynechococcus elongatus* are drawn from coordinates obtained by Guskov et al. [52]; (PDB entry: 3BZ1). PsbP (orange) and PsbQ (green) subunit structures from *Spinacea oleracea* and *Nicotiana tabacum*, respectively, obtained by Ifuku et al. [53]; (PDB entry: 1V2B) and Balsera et al. [54]; (PDB entry: 1VYK), respectively, were placed to their hypothetic position using UCSF Chimera software [55]. Molecular graphics images were produced using Pymol software (DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA).

Table 1

Values of parameters determined from the oxygen yields induced by a train of single turn-over flashes in the presence of various concentrations of methylamine.

Parameters	Methylamine, mM					
	0	4	8	12	16	20
Misses, %	18	14	12	20	25	40
Hits, %	74	77	77	71	69	59
Double-hits, %	1.6	2.1	3	2.8	3.6	1

Remaining fraction is due to inactivations and backward-transitions.

Figure 1

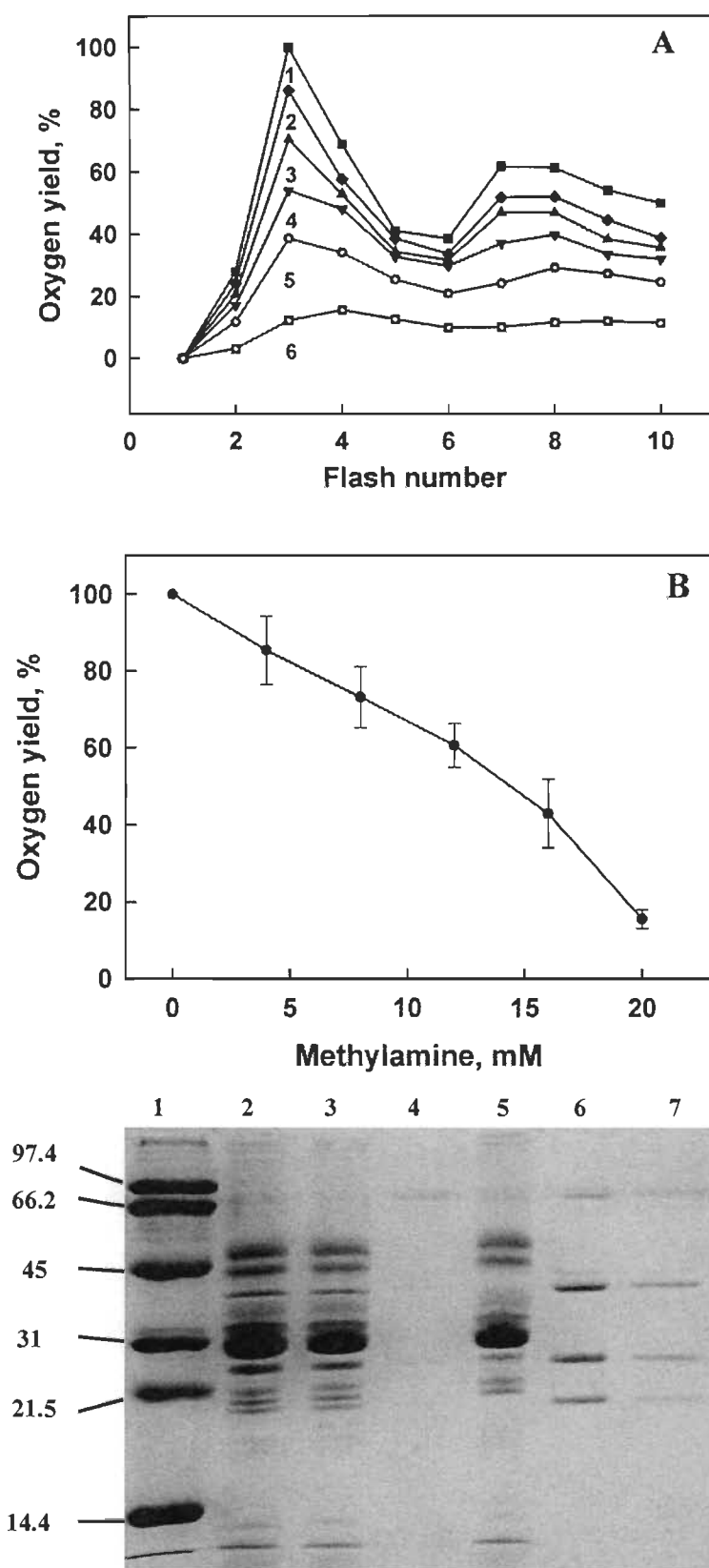
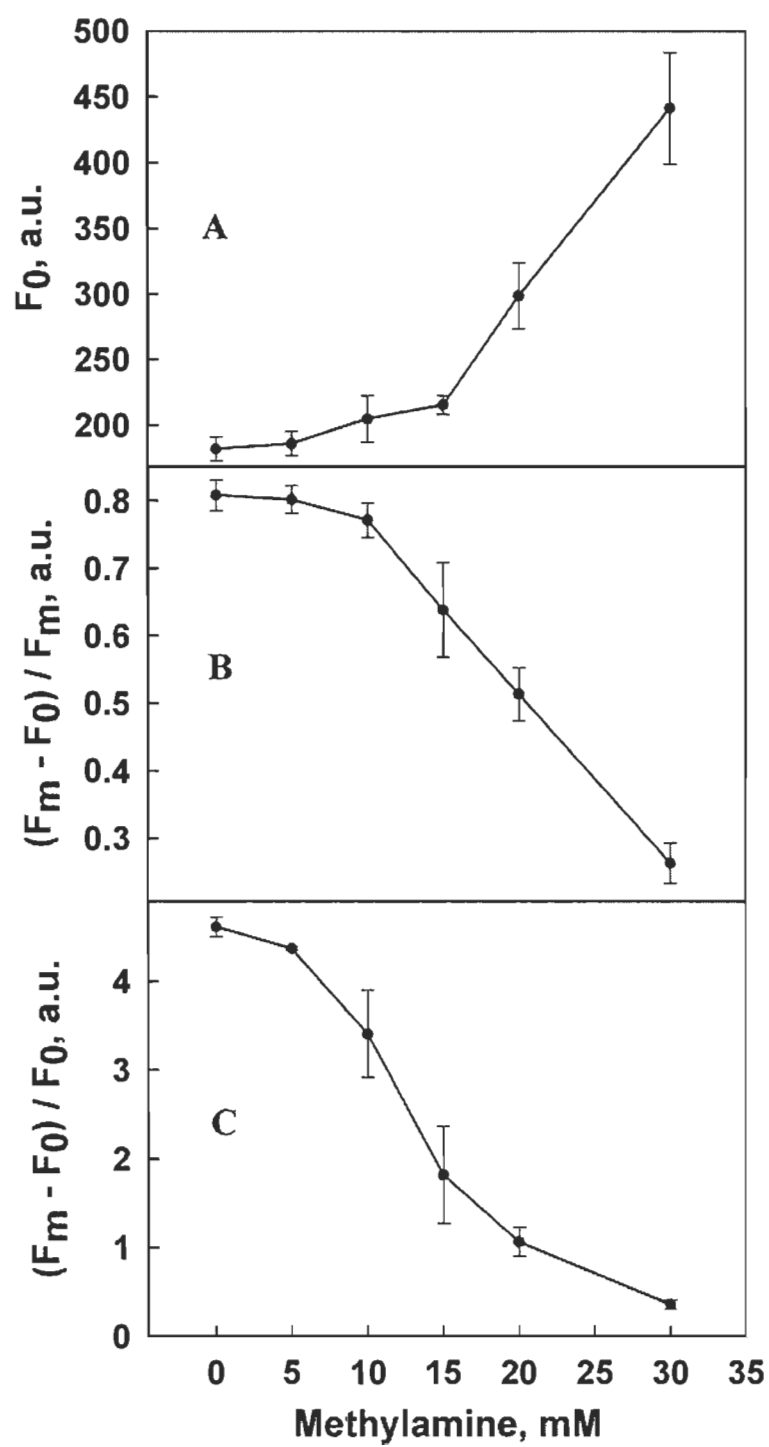


Figure 2



2.8 La thermoluminescence

Les mesures de thermoluminescence ont été effectuées avec un équipement construit en laboratoire et décrit par la référence (117). Les échantillons ont été suspendus dans un milieu d'analyse d'un volume de 200 μ L, contenant 400 mM de sucrose, 50 mM Tricine-NaOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 200 μ g Chl/mL et la concentration spécifiée d'amine. Après une adaptation à la noirceur, les échantillons ont été incubés pendant 2 minutes à 20°C. La température a ensuite été amenée à 0°C à l'intérieur de 5 à 10 s puis conservée pour 60 s; cette température d'incubation a été choisie pour éviter les dommages causés par le gel sur le CEO, lesquels provoquent habituellement des artefacts de mesure selon la référence (117). Un seul flash blanc sursaturant d'une durée de 1 μ s, généré à partir de l'unité XE-ST Pump Flash unit (Walz, Effeltrich, Germany), a été utilisé afin d'initier la séparation de charges dans le PSII. Après le flash, les échantillons ont été chauffés d'une façon linéaire et subséquente dans la noirceur afin d'activer la recombinaison des paires de charges du PSII, lesquelles sont détectables par l'apparence de bandes d'émission à des optimums caractéristiques de température. Les données ont été analysées par la suite avec un programme intitulé ThermoLite développé dans notre laboratoire.

2.9 Mesure de changement d'absorption à 820 nm

La photooxydation de P700 a été mesurée par le changement d'absorption à 820 nm ($\Delta 820$) à l'aide d'une unité ED-P700DW connectée au fluorimètre PAM-101 (Pulse Amplitude Modulated Chl Fluorimeter de Walz) (Figure 2.2). La lumière rouge lointain a été utilisée afin d'exciter préférentiellement le PSI, elle est fournie par une source lumineuse Fiber-Lite (Microview, Thornhill, ON, Canada) contrôlée par un obturateur électronique. Le milieu d'analyse contenait 20 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 500 μ g Chl/mL et la concentration spécifiée d'amine. Toutes les mesures ont été réalisées en présence de 100 μ M de DCMU (inhibiteur de transfert d'électrons entre Q_A et Q_B) afin d'empêcher la réduction du

Figure 3

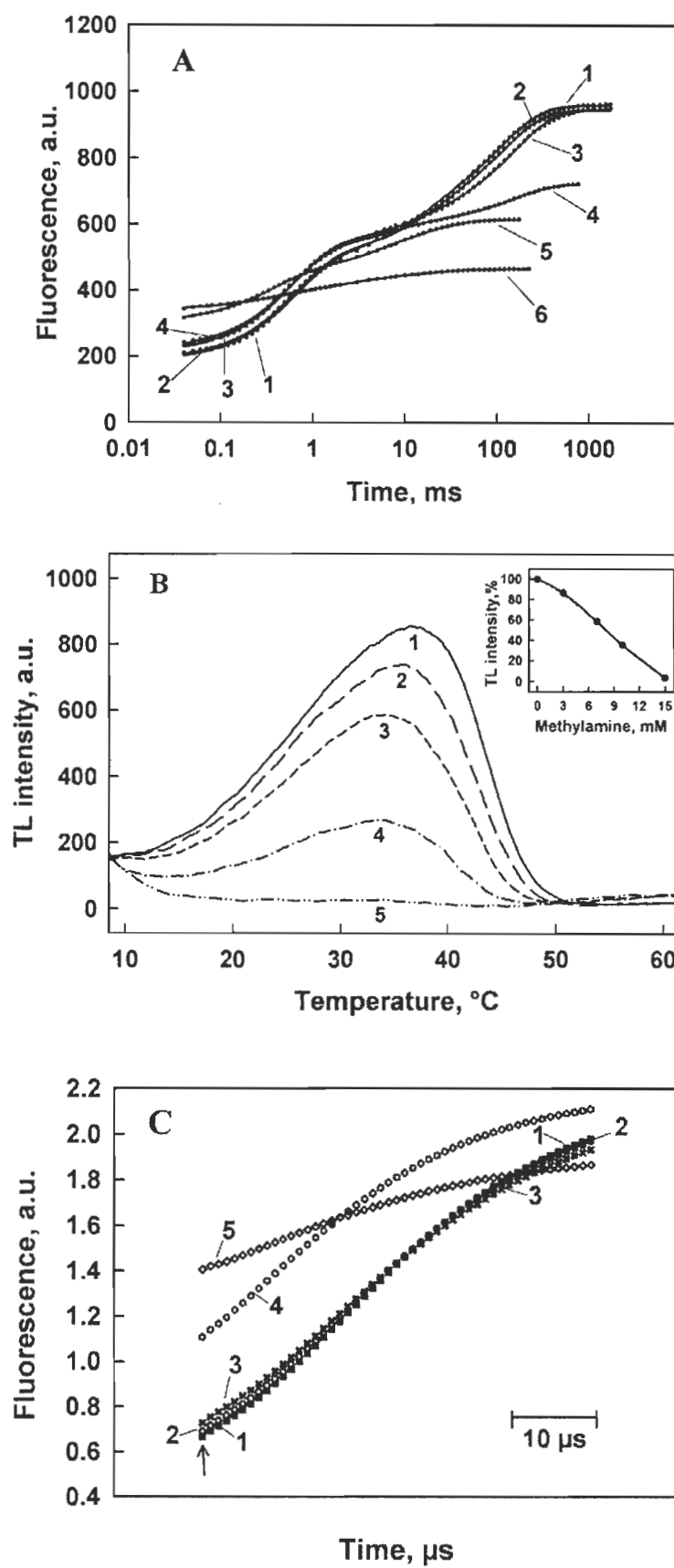
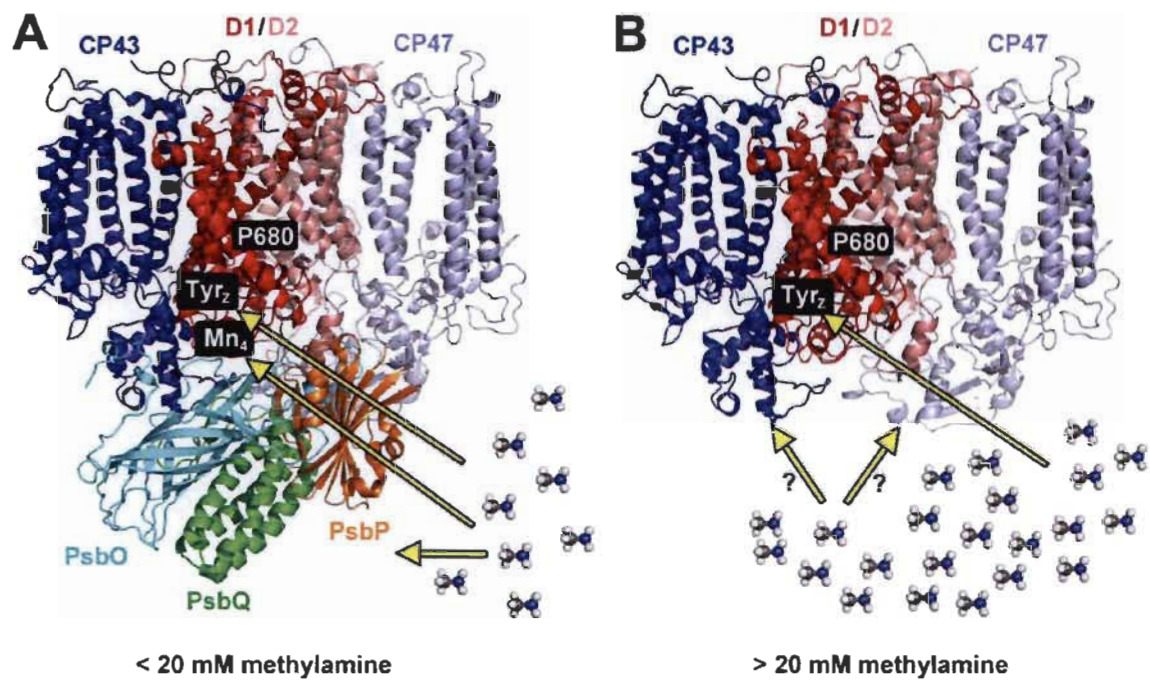


Figure 4



CHAPITRE IV

METHYLAMINE INTERACTION WITH PROTEINS OF PSII: A COMPARISON WITH BIOGENIC POLYAMINES

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2009 dans le journal, *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*: Hamdani, S., Tajmir-Riahi, H.A. et Carpentier, R., Methylamine interaction with proteins of photosystem II: A comparison with biogenic polyamines, vol. 96: 201-206.

Résumé

Bien que l'interaction entre les polyamines endogènes et les protéines du PSII a été investiguée ces dernières années, l'effet de monoamine dans ce type d'interaction est controversé. Cette étude a donc pour but d'élucider le mode d'interaction de la MET avec les protéines du PSII en utilisant des fractions membranaires enrichies en PSII. Les méthodes spectroscopiques telles que la FTIR et la fluorescence des acides aminés ont été utilisées afin de déterminer les modes de liaison de la MET avec les protéines, ainsi que les effets de cette liaison sur la stabilité et la structure secondaire des protéines. Les analyses structurales ont montré que la MET se lie d'une façon non spécifique (pont hydrogène) via les groupes polaires polypeptidiques C=O, C-N et N-H. À forte concentration (15 mM), la MET a provoqué un changement majeur dans la structure secondaire des protéines du PSII, se traduisant par une diminution d'hélices α (de 50 à 35 %) et une augmentation de feuillets β parallèles (de 10 à 16 %). Cette modification structurale a été accompagnée par une inhibition totale du dégagement d'oxygène et une forte réduction de l'induction de la fluorescence chlorophyllienne. La comparaison avec les polyamines endogènes a montré un effet similaire. Cependant une forte altération de la structure secondaire des protéines a été provoquée par la MET, spécialement à forte concentration.

Methylamine interaction with proteins of photosystem II: A comparison with biogenic polyamines

S. Hamdani, H. A. Tajmir-Riahi, R. Carpentier*

*Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Département de Chimie-Biologie,
Université du Québec à Trois-Rivières, C. P. 500, Trois-Rivières (Québec), G9A 5H7,
Canada.*

Key Words: methylamine; photosystem II; oxygen-evolution; protein secondary structure; FTIR spectroscopy.

Abbreviations: Chl, Chlorophyll; FTIR, Fourier transform infrared; OEC, Oxygen evolving complex; PSII, Photosystem II.

*Corresponding author: *E-mail:* robert.carpentier@uqtr.ca

Abstract

The interaction of polyamines with protein of photosystem II (PSII) are well investigated, while there has been no report on the effect of monoamines complexation on photosynthetic oxygen evolution. This study was designed to investigate the interaction of methylamine with proteins of PSII, using PSII-enriched submembrane fractions with various concentrations of methylamine. Fourier transformed infrared (FTIR) and fluorescence spectroscopic methods were used in order to determine the methylamine binding mode, the protein conformational changes, and the effect of amine interaction on photosynthetic oxygen evolution. Spectroscopic evidence showed that methylamine interacts with protein (H-bonding) through polypeptide C=O, C-N and NH groups with major perturbations of protein secondary structure. Major reduction of α -helix from 50% (free PSII) to 35% with an increase of β -sheet from 10% (free PSII) to 16% was observed in methylamine-PSII complexes. At very low methylamine concentration, no inhibition of oxygen-evolution occurred, while at higher amine content (12 mM), 100% inhibition was observed. Chlorophyll (Chl) fluorescence measurements indicated the inhibition mainly affects the oxygen evolving complex (OEC) of PSII. Comparisons of the effects of methylamine with biogenic polyamine spermine, spermidine and putrescine showed a similar mode of binding with protein (H-bonding) through polypeptide C=O, C-N and NH groups. However, major alterations of the protein secondary structure are induced by monoamine and not by polyamines, especially at high concentration.

Introduction

Biogenic polyamines such as putrescine (PUT), spermine (SPM), and spermidine (SPD) are organic cations widely distributed in bacteria, plants, and animals [1-4]. They occur in three different forms: (i) in the free form as cations, (ii) conjugated with small molecules such as phenolic acids, and (iii) bound to various macromolecules such as nucleic acids, phospholipids, and proteins. Their mechanism of action is based on their chemical properties as polycations and possibly connected to their chemical and physical interactions with macromolecules [2]. The binding of polyamines to biological molecules is considered to take part in the regulation of basic processes in plants such as cell division, morphogenesis, stability, as well as responses to environmental and stress conditions [4].

In photosynthetic prokaryotes and chloroplasts of higher plants, photosystem II (PSII) is responsible for water oxidation and the consequent oxygen evolution [5]. Several studies have reported the interaction of polyamines with proteins of PSII (H-bonding) through polypeptides C=O, C-N and N-H groups leading to inhibition of oxygen evolution and electron transport activity [6-8]. In fact, polyamines such as SPM and SPD were shown to strongly interact with the luminal side of PSII causing the release of the three extrinsic polypeptides of 17, 23 and 33 kDa associated with the oxygen evolving complex (OEC) [8]. Moreover, diamines such as PUT and cadaverine also interact with PSII proteins (H-bonding) through polypeptides C=O, C-N and N-H groups with no major perturbation of proteins secondary structure [7]. In recent years, several studies have also shown positive effects of polyamines on the photosynthetic apparatus during photodevelopment, senescence, and various stress conditions [9-16]. The influence of polyamines on the structural organization and functional activity of thylakoid membranes in general was examined in detail, while little attention has been focused on the exact binding mode of monoamines and polyamines and their effects on the structure and dynamics of PSII proteins.

Although the effects of polyamines on protein structure and oxygen evolution of PSII have been reported [5,6], the interaction of methylamine (MET) with proteins of PSII is less investigated. Met could represent an interesting simplified model to better understand the action of polyamines. Several monoamines such as Tris, ammonia, MET and buthylamine are known to reversibly inhibit water oxidation in PSII and affect the distribution of higher S-states of the OEC [17].

We now report the FTIR and fluorescence spectroscopic studies of the interaction of MET with proteins of isolated PSII submembrane fractions. These preparations are used instead of whole thylakoid membranes to gain more specific access to PSII and the OEC. Spectroscopic evidence regarding the MET binding mode and the effects of amine complexation on the protein secondary structure are provided. Furthermore, comparisons between the effects of MET and polyamines on the protein secondary structure and photosynthetic activity of PSII are made here.

Results

Inhibition of oxygen evolution by MET

The influence of MET (free form) on the oxygen evolution activity in PSII submembrane fractions isolated from spinach is shown in Figure 1. At low MET concentration (below 5 mM), there was no major effect on the rate of oxygen evolution, whereas at higher amine content (5 to 15 mM), major inhibition occurred with 100% inhibition at 12 mM (Fig. 1). The maximal effect of MET was reached within the first min of incubation (result not shown). This is indicative of major perturbations of the PSII submembrane fractions at high MET concentration that is consistent with major alterations of protein conformation observed by FTIR spectroscopy, which will be discussed below.

Action of MET on Chl fluorescence properties of PSII submembrane fractions

To further characterize the inhibitory effect, we have analyzed Chl fluorescence properties of the PSII submembrane fractions (Fig. 2A). The initial fluorescence F_0 , observed with the reaction centers in open state, was not significantly influenced by MET. However, F_m , the fluorescence observed with the reaction centers in closed state, was greatly diminished in the similar concentration range as oxygen evolution. Thus, the maximal PSII photochemical quantum yield, F_v/F_m , where $F_v = F_m - F_0$, was also decreased. Calculation of F_v/F_0 , a parameter that simultaneously takes into account the variations in F_m and F_0 [18,19], provided similar traces as Figure 2A (not shown).

To gain more information on the Chl fluorescence induction properties of MET-treated PSII, we analyzed the O-J-I-P induction traces. These traces illustrate the progressive reduction of the quinones located at the acceptor side of PSII with three main phases corresponding to O-J, J-I, and I-P [20,21]. In PSII submembrane fractions the J-I phase is very weak and only the two other phases are seen [22]. Such traces are shown in Figure 2B. A typical transient was observed for the control experiment showing two well defined steps (Fig. 2B, trace 1). As expected from the decreased F_v/F_m (Fig. 2A) Chl fluorescence intensity decreased as MET concentration was raised and at 15 mM the induction was limited to a weakened O-J phase, further fluorescence rise being strongly inhibited. The decline in F_v/F_m together with the decreased amplitudes of O-J and I-P phases of the induction indicate that in the presence of MET, the OEC failed to provide electrons for PSII to reduce adequately the quinone acceptors of the photosystem thus decreasing the maximal fluorescence yield.

FTIR spectra of PSII/MET complexes

The FTIR spectrum ($1800 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) of uncomplexed PSII submembrane fractions was composed of the major protein amide I band (polypeptide C=O stretching) at 1659 cm^{-1} and the amide II band at 1548 cm^{-1} (C-N stretching and N-H bending modes) (Fig. 3). The weak absorption observed at 1513 cm^{-1} is assigned to the tyrosine

amino acid side-chain vibrations [23-26]. Lipid ester carbonyl stretching vibrations [27] were also observed as a band with medium intensity at 1738 cm^{-1} (Fig. 3). A strong and broad band at 3298 cm^{-1} (not shown) is assigned to the polypeptide amide A (N-H stretching vibrations) [23]. The symmetric and antisymmetric C-H stretching [23] of the peptide groups are observed as three sharp absorption bands at 2955, 2926 and 2870 cm^{-1} in the spectrum of PSII submembrane fractions (not shown).

In our studies we focused on the vibrational frequencies located between 1800 and 1500 cm^{-1} . The interaction of MET with proteins of PSII resulted in no major shifting of amide I, amide II, tyrosine, and lipid vibrational modes ($1740 - 1500\text{ cm}^{-1}$). Hence, the difference spectra [(PSII + MET) - (PSII)] were produced in order to measure the intensity variations of these vibrational frequencies in the presence of MET.

At low MET concentration ($< 5\text{ mM}$), no significant spectral changes were observed for the protein amide I band at 1659 cm^{-1} and amide II band at 1548 cm^{-1} , as shown by a flat line in the difference spectra of [(MET - PSII) - PSII] (not shown). As MET concentration increased, major positive features were observed around $1659 - 1658\text{ cm}^{-1}$ and at $1549 - 1548\text{ cm}^{-1}$ in the difference spectra of PSII/methamine complexes (Fig. 3, diffs. 5, 7 and 15 mM). This increase in the intensity of the amide I and amide II bands is due to a major MET interaction with the polypeptides C=O, C-N and N-H groups.

A quantitative secondary structure analysis using the amide I band of the uncomplexed proteins of PSII and of the PSII/MET complexes with various amine concentrations is presented in Figure 4. The untreated PSII proteins showed α -helix ($1655 - 1658\text{ cm}^{-1}$) 50%, β -sheet ($1626 - 1640\text{ cm}^{-1}$) 10%, turn ($1670 - 1678\text{ cm}^{-1}$) 17%, random ($1640 - 1648\text{ cm}^{-1}$) 19%, and β -anti ($1685 - 1691\text{ cm}^{-1}$) 4% (Fig. 4). At low MET content ($< 5\text{ mM}$), no major protein secondary structural changes occurred upon amine-PSII complex formation. However, at higher MET concentrations (7 and 15 mM), major reduction of α -helix from 50% to 42% (7 mM) and to 35% (15 mM) was

observed, while the β -sheet and random coil increased from 10% to 13% (7 mM) and 16% (15 mM) for β -sheet and from 19% to 25% (7 mM) and 27% (15 mM) for random coil structure upon MET complexation, respectively (Fig. 4). The spectroscopic data presented here show that MET binds PSII proteins through non-specific (H-bonding) interaction via polypeptide C=O, C-N and N-H groups.

Amino-acid fluorescence spectra of PSII and thylakoid proteins with MET

The fluorescence emission spectrum of PSII submembrane fractions excited at 270 nm was characterized by a major emission at 300 – 315 nm (Fig. 5A, trace 1) that originates from the intrinsic fluorescence of amino-acid residues in proteins, mainly tryptophan (Trp) and tyrosine (Tyr) [28,29]. Amino-acid fluorescence of PSII submembrane fractions in the presence of different concentrations of MET showed no quenching occurs below 15 mM amine content, while notable quenching of the emission band was observed at higher MET contents (Fig. 5A). However, no further quenching effect was seen above 30 mM MET. The fluorescence emission spectrum of PSII submembrane fractions (Fig. 5A, trace 1) was shifted towards shorter wavelengths compared to the spectrum commonly observed with model proteins such as human serum albumin [30]. Therefore we have analyzed the intrinsic fluorescence from whole thylakoid membranes as a comparative model. In contrast, the amino-acid fluorescence spectrum of whole thylakoid membranes was very similar to previously reported intrinsic fluorescence of proteins with a broad emission range from 310 to 380 nm with a maximum around 330 nm (Fig. 5B). When the effects of MET on proteins of whole thylakoid membranes were studied, major shifting of the fluorescence maximum at 330 nm towards higher wavelength (350 nm) was observed with the similar amine concentrations used for PSII. Strong fluorescence quenching was also seen in parallel with this red shift of the maximum (Fig. 5B).

Discussion

In this work, MET was shown to interact with the polypeptides of PSII submembrane fractions, binding to C=O, C-N and N-H groups. This interaction led to structural modifications including a reduction of α -helices and an increased proportion of β -sheet and random coil structures (Fig. 4). It is reasonable to assume that MET interaction occurs primarily with the extrinsic proteins of PSII. Interaction with the extrinsic polypeptides associated with the OEC and with the Mn_4Ca cluster and/or surrounding amino acids must be responsible for the strong inhibition of PSII activity. Indeed, the inhibition of oxygen evolution and the conformational changes of proteins occurred at similar MET concentrations. It is likely that the destabilisation of the OEC is responsible for the strong inhibition of oxygen evolution with the resulting impairment of quinone reduction on the acceptor side of PSII as shown in the Chl fluorescence measurements (Fig. 2).

The emission spectrum from amino-acid residues of PSII submembrane fractions (Fig. 5A) was restricted to relatively low wavelengths (310 – 315 nm) compared to the emission spectrum usually obtained from model proteins (315 – 360 nm) [30] or from whole thylakoid membranes (Fig. 5B). The intrinsic fluorescence of proteins is mainly due to the fluorescence of Trp and Tyr residues. Thus, their emission spectrum is composed of at least two components originating from Trp (usually with a maximum around 335 nm) and from Tyr (305 nm), the Trp component being much stronger as reflected by the relative fluorescence of these amino-acids in solution (Trp:Tyr = 100:9) [38]. It is well known that the emission spectrum of fluorophores is dependent on their microenvironment [31]; free tryptophan in a polar solution fluoresces at about 355 nm [32]. The blue-shifted position of the fluorescence band of PSII submembrane fractions is indicative of a strongly apolar (lipophylic) environment [28,29] likely due to the presence of the detergent Triton (X-100) with the preparation. The PSII submembrane fractions are obtained by digestion of the thylakoid membranes using the detergent Triton (X-100). It is known that Triton (X-100) is an apolar molecule. In contrast, the amino-acid fluorescence emission of whole thylakoid membranes widened to longer

wavelengths. The above reflected the protein fluorophores in whole thylakoids being exposed to various microenvironments of different polarities with a significant proportion of polypeptides being exposed to hydrophilic surroundings.

In both isolated PSII submembrane fractions and whole thylakoid membranes, the amino-acid fluorescence was seriously quenched in the presence of MET (Fig. 5). The partial protein unfolding observed during the FTIR measurements (conversion of α -helices into β -sheet and random coil structures upon MET interaction) appears to precede this quenching as the MET concentration required (20 mM in PSII preparations, Fig. 5A) is above the concentration for the initiation of conformational changes (5 mM, Figs. 3 and 4). It is likely that the partial unfolding gives access for MET to the environment of the fluorescent residues, mainly tryptophan. Thus, the amino-acid fluorescence data confirm that at the MET concentrations required for inhibition of oxygen evolution with the start of protein unfolding, only extrinsic domains of PSII are affected as higher concentration is necessary for the inhibitor to reach the more inner domains and produce fluorescence quenching.

In whole thylakoids, significant amino-acid fluorescence quenching is already observed at 10 mM MET. Therefore, the apolar environment of PSII submembrane fractions owing to the presence of Triton (X-100) clearly restricts the access of the inhibitor to the fluorophores. The emission band of free thylakoid membranes observed with a maximum around 340 nm indicates that a large fraction of tryptophan residues is exposed to hydrophilic environment [32] and these residues are probably more accessible to MET. With increasing concentrations of MET, this maximum was progressively shifted towards higher wavelengths (up to 355 nm) (Fig. 5B). Obviously, this was due to a further protein unfolding that must have exposed more residues to the surrounding polar environment. However, no major shifting of the emission band was observed in PSII preparations (Fig. 5A). This result illustrates that tryptophan residues are located in hydrophobic environment before and after MET interaction with PSII proteins due to the presence of Triton (X-100) in the solution.

A comparison with biogenic polyamines such as SPM and SPD, and with diamines showed similar mode of binding with proteins of PSII submembrane fractions (H-bonding) through polypeptides C=O, C-N and N-H groups [6-8]. However, stronger effects are observed for MET than biogenic polyamines on the protein secondary structure (Table 1). At 15 mM MET, 30% reduction of alpha-helix structure was observed (51 to 35%) with 100% inhibition of oxygen evolution, while for diamines (cadaverine, 1,3-diaminopropane and PUT) and polyamines (SPM and SPD) the reduction of alpha-helix structure does not exceeded 4% (51 to 49%) and 25% (47 to 35%) respectively, at higher polyamine concentrations (20 mM) (Table 1). This clearly shows the stronger affinity of MET for protein complexation than diamines and polyamines. Because of its small size, MET may also have access to more inner parts of extrinsic proteins of PSII, while diamines and polyamines probably bind onto surface.

Experimental procedures

Materials

MET (40 wt. % solution in water) was purchased from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO) and used as supplied.

Isolation of PSII submembrane fractions

PSII submembrane fractions were isolated from thylakoid membranes according to Berthold et al. [33] with minor modifications. After incubation for 90 min in the dark at ice-cold temperature, Triton (X-100) was added under shaker for 1 min to obtain a final concentration of 2.35% (v/v) and 1 mg Chl mL⁻¹. This solution was incubated 1 min in the dark and centrifuged for 4 min at 600 X g. The supernatants were further centrifuged for 15 min at 35300 X g. The resulting pellet was suspended in the buffer containing 20 mM Mes-NaOH (pH 6.2), 15 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, and 400 mM sucrose. The homogenate was centrifuged for 4 min at 4960 X g. The resulting supernatants were centrifuged for 15 min at 35300 X g and the pellets were suspended in the same buffer. This new homogenate was centrifuged for 15 min at 35300 X g. Finally the pellet was

suspended in the same buffer and the Chl content was determined as described previously [34].

Oxygen evolution

The rate of oxygen evolution in the PSII submembrane fraction was measured at 24°C, using Oxylab system (Hansatech Instrument, Norfolk, England). The assay medium contained 20 mM MES-NaOH (pH 6.2), 1 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.35 mM DCBQ (2,5-dichlorobenzoquinone) as PSII electron acceptor, 25 µg Chl mL⁻¹ and the specified concentrations of MET. The sample was illuminated with continuous saturating white light.

Chl fluorescence induction (FI) measurements

FI measurements were performed at room temperature using the Plant Efficiency Analyser (Hansatech Instrument, Norfolk, UK) as described elsewhere [8]. The assay medium contained 400 mM sucrose, 20 mM MES-NaOH (pH 6.2), 15 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 25 µg Chl mL⁻¹ and the specified concentrations of MET. Dark-adapted samples were excited with saturating red actinic light (655 nm and an intensity of 3000 µmol m⁻² s⁻¹) provided by light emitting diodes. As the fluorescence signal during the first 40 µs is ascribed for artefacts due to delay in response time of the instrument, these data were not included in the analyses of FI traces. The signal at 40 µs was taken as F_0 , the initial fluorescence. Variable fluorescence, F_v (the difference between F_0 and the maximal fluorescence, F_m , in dark adapted samples), was used to calculate the F_v/F_m and F_v/F_0 ratios.

FTIR measurements

Infrared spectra were recorded on a FTIR spectrometer (Impact 420 model), equipped with deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector and KBr beam splitter, using AgBr windows. MET was added to the PSII submembrane fractions at

concentrations of 5, 7 and 15 mM. Hydrated films were prepared from these preparations as described before [6,7]. Interferograms were accumulated over the spectral range 4000 - 600 cm^{-1} with a nominal resolution of 2 cm^{-1} and 40 scans. The difference spectra [(PSII + MET) - (PSII)] were generated using the Triton (X-100) band at 1271 cm^{-1} [35], as external standard. When producing difference spectra the Triton (X-100) band was adjusted to the baseline level, in order to normalize difference spectra. Details regarding infrared spectral treatment are given in our recent publication [7].

Analysis of protein secondary structure

Analysis of the secondary structure of PSII proteins were carried out on the basis of the procedure previously reported [36]. The protein secondary structure is determined from the shape of the amide I band, located around 1660 - 1650 cm^{-1} . The FTIR spectra were smoothed and their baselines were corrected automatically using Grams AI software. Thus the root-mean square (rms) noise of every spectrum was calculated. By means of the second derivative in the spectral region 1600 - 1700 cm^{-1} seven major peaks for free PSII and the complexes were resolved. The above spectral region was deconvoluted by the curve-fitting method with the Levenberg-Marquadt algorithm and the peaks corresponds to α -helix (1654 - 1660 cm^{-1}), β -sheet (1637 - 1614 cm^{-1}), turn (1678 - 1670 cm^{-1}), random coil (1648 - 1638 cm^{-1}) and β -antiparallel (1691 - 1680 cm^{-1}) were adjusted and the area was measured with the Gaussian function. The area of all the component bands assigned to a given conformation were then summed up and divided by the total area [37]. The curve-fitting analysis was performed using the GRAMS/AI Version 7.01 software of the Galactic Industries Corporation.

Amino-acid fluorescence spectroscopy

Fluorescence measurements were carried out on a Perkin-Elmer LS55 spectrofluorometer as described previously [30]. The assay medium contained 400 mM sucrose, 20 mM MES-NaOH (pH 6.2), 15 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 5 $\mu\text{g Chl mL}^{-1}$ and

the specified concentrations of MET. The fluorescence spectra were recorded at $\lambda_{\text{excitation}} = 270 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{emission}}$ from 280 to 400 nm. The excitation and emission spectral widths were fixed at 5 nm. Emission spectra were corrected according to the photomultiplier sensitivity using the correction factor provided by Perkin-Elmer.

Acknowledgments

The authors are indebted for the financial supports of Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

References

- 1 Slocum RD & Flores HE (Eds.) (1991) Polyamines biosynthesis in plants, the biochemistry and physiology of polyamines in plants. CRC Press, Boca Raton, Fl 23–40.
- 2 Tabour CW & Tabour H (1984) Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 749-790.
- 3 Smith TA (1985) polyamines. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36, 117–143.
- 4 Smith TA & Best GR (1977) Polyamines in barley seedlings. *Phytochemistry* 16, 841–843.
- 5 Sproviero EM, Gascon JA, McEvoy JP, Brudvig GW & Batista VS (2008) Quantum mechanics/molecular mechanics study of the catalytic cycle of water splitting in photosystem II. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 3428–3442.
- 6 Bograh A, Gingras Y, Tajmir-Riahi HA & Carpentier R (1997) The effects of spermine and spermidine on the structure of photosystem II proteins in relation to inhibition of electron transport. *FEBS Lett.* 402, 41–44.
- 7 Beauchemin R, Harnois J, Rouillon R, Tajmir-Riahi HA & Carpentier R (2007) Interaction of polyamines with proteins of photosystem II: cation binding and photosynthetic oxygen evolution. *J. Mol. Struct.* 833, 169–174.
- 8 Beauchemin R, Gautier A, Harnois J, Boisvert S, Govindachary S & Carpentier R (2007) Spermine and spermidine inhibition of photosystem II: disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from TyrZ to P680+ and the quinone acceptors QA- to QB. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 905–912.

- 9 Kim TW & Heinrich G (1995) Effects of Sr^{2+} , Ca^{2+} , and spermine on thylakoid protein and chlorophyll degradation during dark incubation of sugar beet leaf discs. *Photosynthetica Prague* 31, 315–319.
- 10 Beigbeder A, Vavarakis M, Navakoudis E & Kotzabasis K (1995) Influence of polyamine inhibitors on light-independent and light-dependent chlorophyll biosynthesis and on the photosynthetic rate. *J. Photochem. Photobiol. B* 28, 235–242.
- 11 Iordanov IT, Goltsev V, Doltchinkova V & Kruleva L (1989) Effect of some polyamines on the functional activity of thylakoid membranes. *Photosynthetica* 23, 314–323.
- 12 Beigbeder A & Kotzabasis K (1994) The influence of exogenously supplied spermine on protochlorophyllide and chlorophyll biosynthesis. *J. Photochem. Photobiol. B* 23, 201–206.
- 13 Szalai G, Janda T, Bartok T & Paldi E (1997) Role of light in changes in free amino acid and polyamine contents at chilling temperature in maize. *Physiol. Plant.* 101, 434–438.
- 14 Kotzabasis K & Dörnemann D (1998) Differential changes in the photosynthetic pigments and polyamine content during photoadaptation and photoinhibition of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*. *Z. Naturforsch.* 53c, 833–840.
- 15 Kotzabasis K, Strasser B, Navakoudis E, Senger H & Dörnemann D (1999) The regulatory role of polyamines in structure and functioning of the photosynthetic apparatus during photoadaptation. *J. Photochem. Photobiol. B* 50, 45–52.

- 16 Legocka J & Zajchert I (1999) Role of spermidine in the stabilization of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II during leaf senescence process. *Acta Physiol. Plant.* 21, 127-132.
- 17 Sandusky PO & Yocum CF (1986) The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution: factors affecting nucleophilic displacement of chloride from the oxygen-evolving complex. *Biochim. Biophys. Acta* 849, 85–93.
- 18 Babani F & Lichtenthaler HK (1996) Light-induced and age-dependent development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments. CO₂ assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *J. Plant Physiol.* 148, 555–566.
- 19 Govindachary S, Bukhov N, Joly D & Carpentier R (2004) Photosystem II inhibition by moderate light under low temperature in intact leaves of chilling-sensitive and tolerant plants. *Physiol. Plant.* 121, 322– 333.
- 20 Lazar D (2006) The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct. Plant Biol.* 33, 9–30.
- 21 Zhu XG, Govindjee, Baker NR, Desturler E, Ort DR & Long SP (2005) Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with photosystem II. *Planta* 223, 114–133.
- 22 Pospíšil P & Dau H (2000) Chlorophyll fluorescence transients of photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth. Res.* 65, 41–52.

- 23 Krimm S & Bandekar J (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* 38, 181–364.
- 24 MacDonald GM & Barry BA (1992) Difference FT-IR study of a novel biochemical preparation of photosystem II. *Biochemistry* 31, 9848–9856.
- 25 Fabian H, Schultz C, Backmann J, Hahn U, Saenger W, Mantsch HH & Naumann D (1994) Impact of point mutations on the structure and thermal stability of ribonuclease T1 in aqueous solution probed by fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 33, 10725–10730.
- 26 Noguchi T, Ono TA & Inoue Y (1992) Detection of structural changes upon S1-to-S2 transition in the oxygen-evolving manganese cluster in photosystem II by light-induced fourier transform infrared difference spectroscopy. *Biochemistry* 31, 5953–5956.
- 27 Jackson M & Mantsch HH (1993) Biomembrane structure from FT-IR spectroscopy. *Spectrochim. Acta Rev.* 15, 53–69.
- 28 Casals C, Miguel E & Perez-Gil J (1993) Tryptophan fluorescence study on the interaction of pulmonary surfactant protein A with phospholipid vesicles. *Biochem. J.* 296, 585–593.
- 29 Louzada PR, Sebollela A, Scaramello ME & Ferreira ST (2003) Predissociated dimers and molten globule monomers in the equilibrium unfolding of yeast glutathione reductase. *Biophys. J.* 85, 3255–3261.
- 30 N'soukpoe-Kossi CN, St-Louis C, Beauregard M, Subirade M, Carpentier R, Hotchandani S & Tajmir-Riahi HA (2006) Resveratrol binding to human serum albumin. *J. Biomol. Struc. Dyn.* 24, 277–283.

- 31 Klajnert B, Stanislawska L, Bryszewska M & Palecz B (2003) Interaction between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* 1648, 115–126.
- 32 Yong Y, Rong L, Chunhe X, Kangcheng R, Yunkang S & Govindjee (2001) N bromosuccinimide modification of tryptophan 241 at the C-terminus of the manganese stabilizing protein of plant photosystem II influences its structure and function. *Physiol. Plant.* 111, 108–115.
- 33 Berthold DA, Babcock GT & Yocum CF (1981) A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes EPR and electron-transport properties. *FEBS Lett.* 134, 231–234.
- 34 Porra RJ, Thompson WA & Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975, 384–394.
- 35 Bograh A, Carpentier R & Tajmir-Riahi HA (1999) The effect of cholesterol on the solution structure of proteins of photosystem II. Protein secondary structure and photosynthetic oxygen evolution. *J. of Colloid Interface Sci.* 210, 118–122.
- 36 Ahmed A, Tajmir-Riahi HA & Carpentier R (1995) A quantitative secondary structure analysis of the 33 kDa extrinsic polypeptide of photosystem II by FTIR spectroscopy. *FEBS Lett.* 363, 65–68.
- 37 Vandenbussche G, Celers A, Curstedt T, Johansson J, Jornvall H & Ruysschaert JM (1992) Structure and orientation of the surfactant-associated protein C in a lipid bilayer. *Eur. J. Biochem.* 203, 201–209.

- 38 Cantor CR & Schimmel PR (1980) in Biophysical Chemistry. Part II. Techniques for the study of biological structures and function, Freeman, New York.

dans un tampon de mesure composé de 400 mM de sucrose, 40 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ et la concentration spécifiée d'amine. La concentration de Chl a été fixée à 200 µg/mL pour un volume final de 100 µL. Après une incubation de 3 min à la noirceur, les échantillons ont été exposés à une série de 12 flashes lumineux actiniques de 4 joules, d'une durée de 10 µs par flash, avec une fréquence de base de 2 Hz pour illuminer l'échantillon.

2.6 Induction de fluorescence

Les mesures d'induction de fluorescence ont été effectuées à la température pièce en utilisant le Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK). Le milieu d'analyse de 1 mL contenait 250 mM sorbitol, 20 mM Tricine KOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 25 µg Chl/mL et la concentration spécifiée d'amine. Les échantillons adaptés à la noirceur pendant 1 minute à température pièce ont été excités avec une lumière actinique rouge ($\lambda = 655$ nm, intensité de 3000 µmol m⁻² s⁻¹) obtenue par des diodes émettrices de lumière. Comme le signal de fluorescence mesuré durant les 40 premières µs est attribué à des artefacts de mesures causés par le temps de réponse de l'instrument, ces données n'ont pas été incluses dans l'analyse des courbes d'induction de fluorescence. Le signal à 40 µs est considéré comme F_0 (la fluorescence initiale). La fluorescence variable, F_v (la différence entre F_0 et la fluorescence maximale, F_m dans les échantillons adaptés à la noirceur), a été utilisée pour calculer les ratios F_v/F_m et F_v/F_0 .

2.7 Mesure de spectre de fluorescence à 77 K

Les spectres d'émission de fluorescence à 77 K ont été mesurés avec un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS55 équipé d'un photomultiplicateur R928 sensible à la portion rouge du spectre. L'échantillon a été excité à 436 nm. Les fentes d'excitation et d'émission du fluorimètre ont été fixées à 5 et 2.5 nm, respectivement. La concentration finale de Chl a été ajustée à 5 µg/mL.

Figure legend

Figure 1

Effect of increasing MET concentrations on the oxygen evolution activity of PSII submembrane fractions. The assay medium contained 20 mM MES-NaOH (pH 6.2), 1 mM NaCl, 0.5 mM MgCl_2 , 0.35 mM DCBQ (2,5-dichlorobenzoquinone) as PSII electron acceptor, $25 \mu\text{g Chl mL}^{-1}$ and the specified concentrations of MET (3 – 12 mM).

Figure 2

Effect of increasing MET concentration in PSII submembrane fractions ($25 \mu\text{g Chl mL}^{-1}$) on Chl fluorescence properties. (A): $(F_m - F_0)/F_m$ and (B): Chl *a* fluorescence induction: trace 1, control; trace 2, 5 mM of MET; trace 3, 15 mM of MET; trace 4, 30 mM of MET. Data points in panel A are the averages of 3 experiments (6-9 assays per point).

Figure 3

FTIR spectrum (top curve) and difference spectra [(PSII + MET) - (PSII)] (bottom three curves) of free PSII (1 mg Chl mL^{-1}) and PSII with various concentrations of MET (5, 7 and 15 mM) in the region of $1800 - 1500 \text{ cm}^{-1}$. The FTIR spectrum of MET alone is also given for comparison (no IR absorption around 1600 cm^{-1}).

Figure 4

Second derivative resolution enhancement and curve-fitted amide I region ($1700 - 1612 \text{ cm}^{-1}$) of IR spectra for free PSII and PSII with 7 or 15 mM MET.

Figure 5

Effect of increasing MET concentrations on the amino-acid fluorescence emission spectra; pH 6.2, $\lambda_{\text{exc}} = 270 \text{ nm}$, temperature = $24 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. (A) Fluorescence emission spectra from PSII submembrane fractions with MET; trace 1, free PSII ($5 \text{ } \mu\text{g Chl mL}^{-1}$); traces 2 to 5, PSII-MET complexes: MET concentrations were 15, 20, 25, and 30 mM, respectively (no significant modification of fluorescence emission spectra below 15 mM MET). (B) Fluorescence emission spectra from whole thylakoid membranes with MET; trace 1, free thylakoid membranes ($5 \text{ } \mu\text{g Chl mL}^{-1}$); traces 2 to 6, thylakoid-MET complexes: MET concentrations were 10, 15, 20, 25, and 30 mM, respectively.

Table 1

Secondary structure determination of proteins in PSII submembrane fractions in the presence of monoamine (MET), diamines (cadaverine, 1.3-diaminopropane, PUT), and polyamines (SPM, SPD).

Amide I (cm ⁻¹)	Conformation	% of conformation								
		<u>monoamine (mM)</u>		<u>diamines[*] (mM)</u>				<u>polyamines^{**} (mM)</u>		
		0	15	0	20	20	20	0	20	20
1654-1660	α -Helix	50	35	51	49	50	49	47	35	37
1614-1637	β -Sheet	10	16	11	15	13	15	11	20	21
1638-1648	Random	19	27	19	19	19	19	16	17	17
1670-1678	Turn	17	12	14	12	13	12	19	19	18
1680-1691	β -antiparallel	4	10	5	5	5	5	7	9	7

*diamine : (cadaverine, 1.3-diaminopropane and PUT, respectively) data from Ref. 7.

** polyamines : (SPM and SPD, respectively) data from Ref. 6.

Figure 1

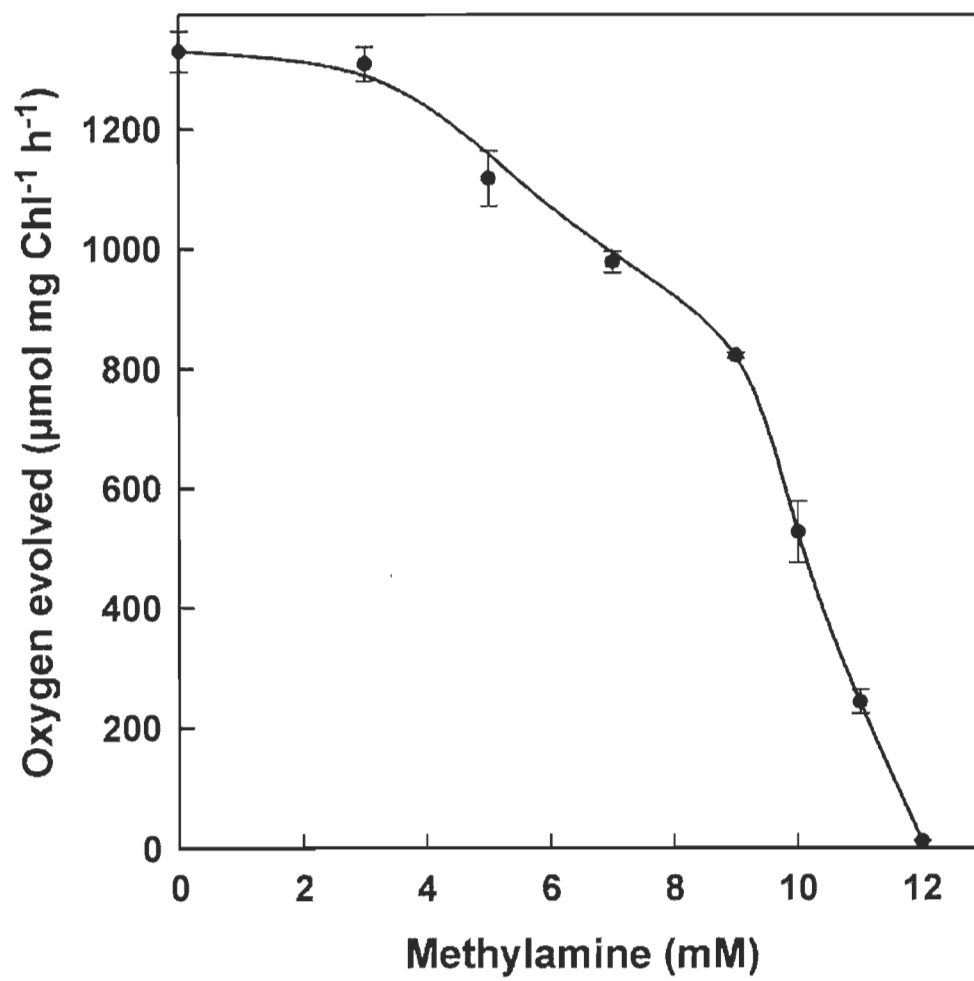


Figure 2

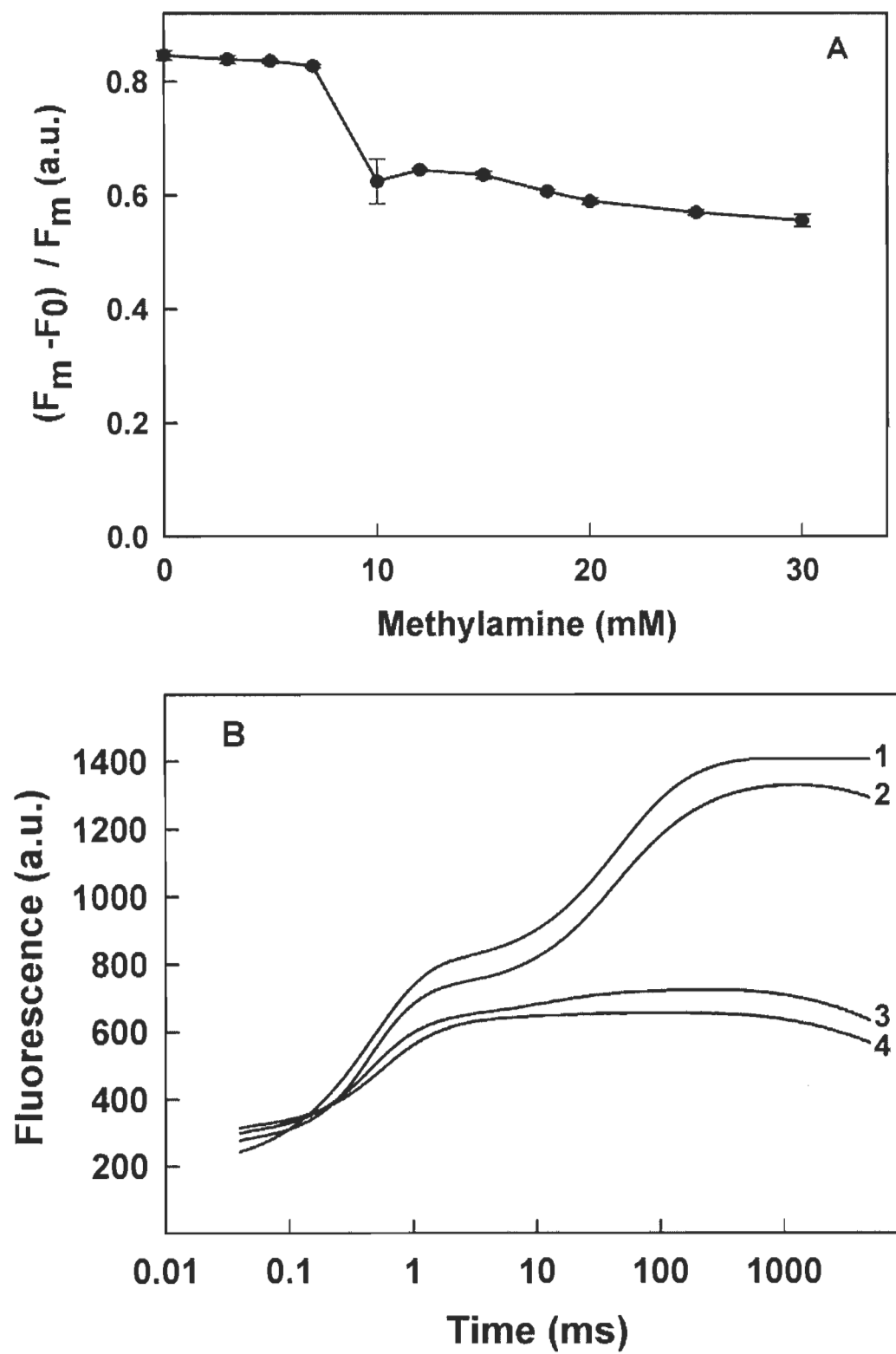


Figure 3

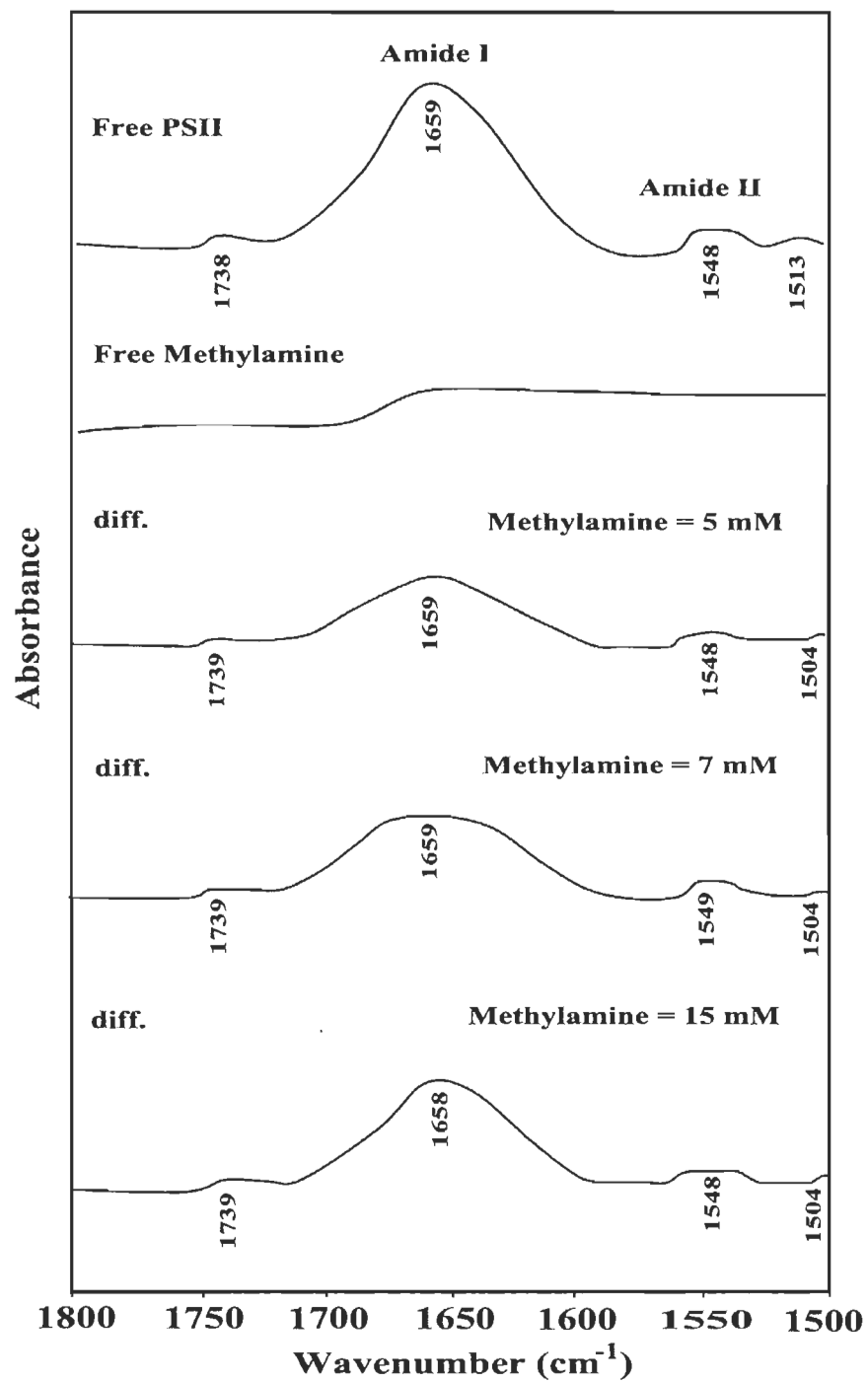


Figure 4

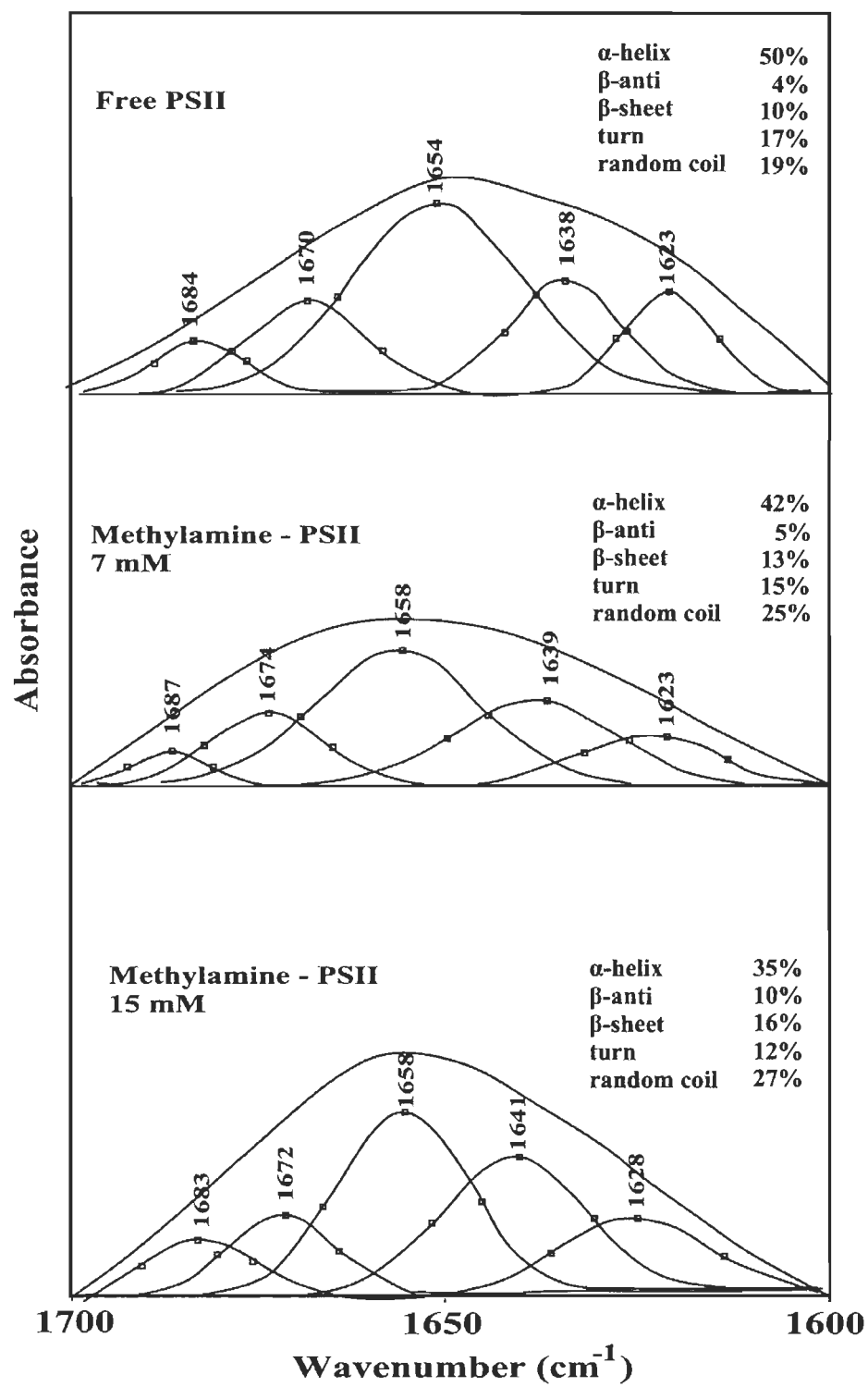
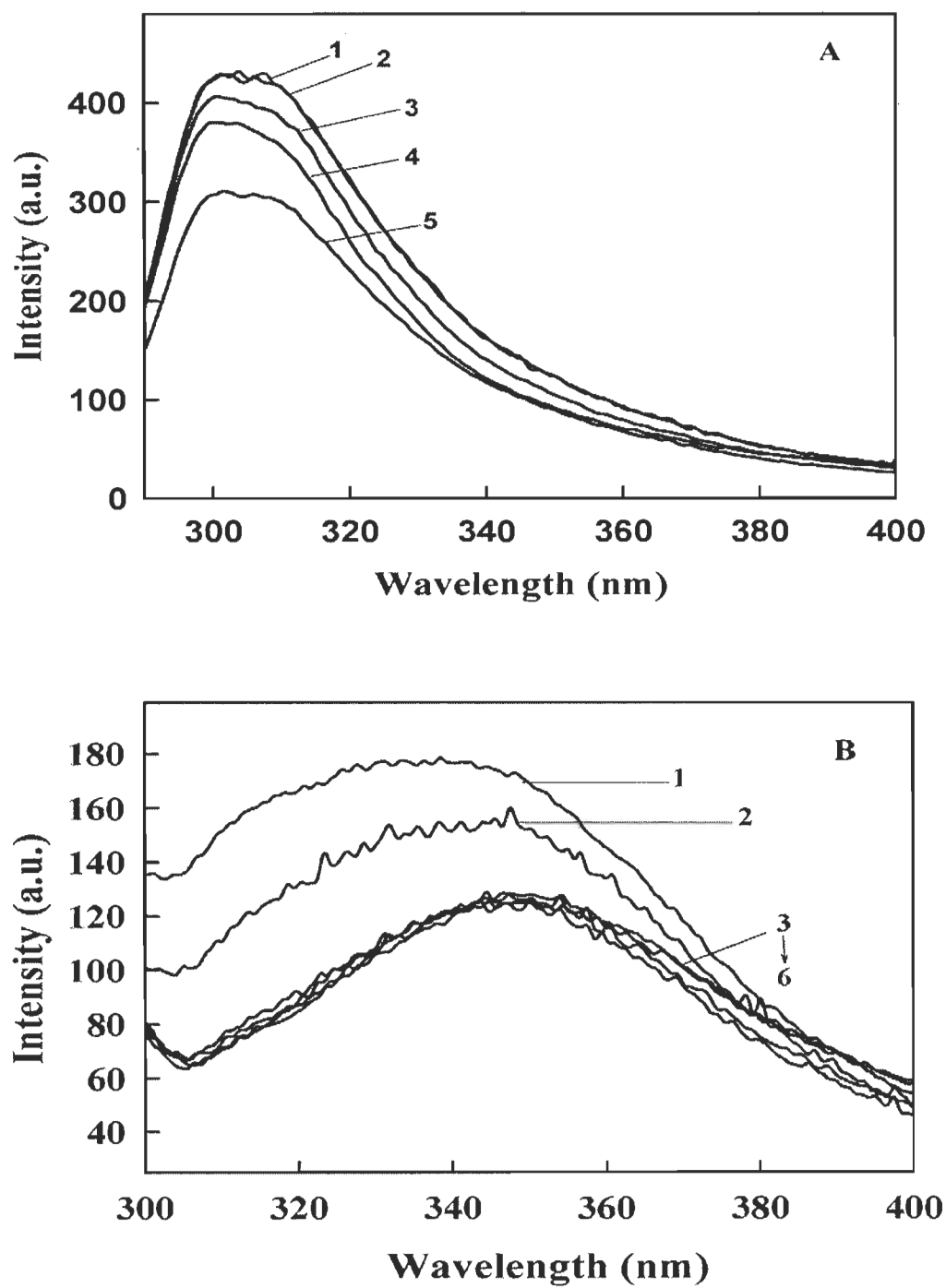


Figure 5



CHAPITRE V

POSITIVE CHARGES OF POLYAMINES PROTECT PHOTOSYSTEM II IN ISOLATED THYLAKOID MEMBRANES DURING PHOTOINHIBITORY CONDITIONS

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2011 dans le journal, *Plant Cell Physiology* : Hamdani, S., Gauthier, A., Msilini, N., Carpentier, R., Positive charges of polyamines protect photosystem II in isolated thylakoid membranes during photoinhibitory conditions, vol. 52: 866-873.

Résumé

Le rôle de charges positives des amines (SPM, PUT et MET) dans la protection du photosystème II contre la photoinhibition a été investigué moyennant différentes techniques spectroscopiques. Sous une lumière de forte intensité, appliquée à l'échantillon de thylakoïdes, le dégagement d'O₂, l'induction de la fluorescence et la thermoluminescence ont été affectés. L'addition exogène de 1 mM de SPM avant la photoinhibition a limité l'inhibition par rapport au témoin photoinhibé, alors que l'effet des amines (PUT et MET) n'a pas été significatif. Parmi les amines étudiées, seule la SPM a pu limiter les dommages causés par la photoinhibition. Cette protection peut être expliquée par la nature polycationique de la SPM (quatre charges positives à pH physiologique), qui peut stabiliser les parties hydrophiles des protéines par des interactions électrostatiques.

Running title:

Protective effect of spermine during photoinhibition of thylakoid membranes

Author for correspondence:

Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières,
Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7, Phone: 1-819-376-5011 ext. 3300, Fax: +1-
819-376-5057, E-mail: Robert.Carpentier@uqtr.ca.

Subject areas:

Photosynthesis, respiration and bioenergetics.

Number of black and white figures, color figures and tables:

5 white figures and 1 color figure

Title:

Positive Charges of Polyamines Protect Photosystem II in Isolated Thylakoid Membranes During Photoinhibitory Conditions.

Authors:

Saber Hamdani, Alain Gauthier, Najoua Msilini and Robert Carpentier*

Author address:

*Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7.

Abbreviations:

Chl, chlorophyll; D1 and D2, heterodimeric core of PSII; FI, chlorophyll fluorescence induction; F_m , maximal level of chlorophyll fluorescence; F_v , variable chlorophyll fluorescence; F_o , basal level of chlorophyll fluorescence; LHC, light harvesting complex; MET, methylamine; MSP, manganese stabilizing protein; OEC, oxygen-evolving complex; Pheo, pheophytin; PI, photoinhibited sample; PS, photosystem; PQ, plastoquinone; P680, primary electron donor of photosystem II; PUT, putrescine; Q_A and Q_B , primary and secondary quinone acceptors of photosystem II; RC, reaction center; TL, thermoluminescence; T_m , temperature maximum of thermoluminescence emission; SPD, spermidine; SPM, spermine; Y_D , the redox active tyrosine 160 of D2 protein; Y_Z , the redox active tyrosine 161 of D1 protein.

Abstract

The effects of the positive charges of amines such as spermine (SPM), putrescine (PUT), and methylamine (MET) in the protection of photosystem II (PSII) against excessive illumination were investigated in isolated thylakoid membranes. Under photoinhibition conditions water oxidation, the kinetics of Chl fluorescence rise, and charge recombination in PSII were affected. Low concentration of SPM (1 mM) added before photoinhibition showed a significant improvement of F_v/F_0 , the oxygen yield, and the amplitude of the B-band of thermoluminescence compared to the other amines. Amongst the amines studied, only SPM could protect the photosynthetic apparatus under photoinhibition conditions. This protection was likely provided by the polycationic nature of SPM (four positive charges at physiological pH), which can stabilize surface exposed proteins of PSII through electrostatic interaction.

Key words: polyamines; photoinhibition; thylakoid membranes.

Introduction

Photosystem II (PSII) is a membrane bound protein complex that contains chlorophyll, plastoquinone (PQ), manganese (Mn) and several other bound cofactors, which catalyses the light driven oxidation of water and the reduction of PQ in cyanobacteria and plants (Nanba and Satoh 1987). Water oxidation occurs at a Mn cluster located on the luminal side of PSII (Sproviero et al. 2008). The photochemical events are initiated by the capture of incident photons by the antenna complexes. The absorbed energy is quickly transferred to the photochemical reaction centers (RC), located on the D1 protein, where the excited singlet states of the special chlorophyll (Chl) *a*, P680, reduces a pheophytin (Pheo) molecule. Stabilization of the charge separated state occurs with the electron transfer from Pheo⁻ to Q_A, the primary quinone of PSII, forming P680⁺Q_A⁻. The P680⁺ radical oxidizes tyrosine Y_Z (Tyrosine 161 of D1). The latter is reduced by electrons originating from the Mn cluster. At this site, water oxidation is performed through the so-called S-state cycle, $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$, requiring four successive quanta of excitation. Concurrent with the release of dioxygen from water, the S₄-state decays to the S₀-state after the 4th step. At the acceptor side, Q_A⁻ reduces the secondary quinone, Q_B, in a two step process leading to the formation of plastoquinol (PQH₂).

PSII is considered as the most sensitive photosystem to excessive illumination and is primarily affected by photoinhibition (Powles 1984). This usually occurs when photosynthetic organisms are exposed to high light intensity, causing the imbalance between the rate of absorption of light energy by photosynthetic pigments and the rate of consumption of CO₂ in the chloroplast (Powles 1984, Adams and Adams 1992, Melis 1999). However the molecular mechanism of photoinhibition of PSII has been subject of controversy. Some investigations suggested the acceptor side as the predominant initial photoinactivation site. In fact, under high light intensity the PQ pool remains in the fully reduced state blocking the electron flow between Q_A and Q_B. Consequently, the yield of recombination of the primary radical pair P680⁺Pheo⁻ increases leading to the formation of chlorophyll triplet states and generation of singlet oxygen molecules (¹O₂) which are

responsible for photodamage of the D1 protein of PSII (Mathis et al. 1989, Styring et al. 1990, Vass et al. 1992, Tyystjarvi 2008). However, several studies have considered the donor side as the primary target of photoinhibition (Callahan et al. 1986, Jegerschold et al. 1990, Jegerschold et al. 1991, Murata et al. 2007). This condition is produced when the OEC is partially or fully inactivated after absorption of light by the Mn cluster (Hakala et al. 2005, Allakhverdiev and Murata 2004). Consequently, the electron flow from OEC to $P680^+$ is blocked. As a result, the levels of $P680^+$ and Yz^+ remain high. These radicals are thought to be responsible for photoinhibition damage (Hakala et al. 2005, Ohnishi et al. 2005, Zsiros et al. 2006).

Plants respond and adapt to photoinhibition with appropriate physiological, developmental, and biochemical changes to prevent the damage occurred by this stress condition. Polyamines (PAs), such as putrescine (PUT), spermidine (SPD) and spermine (SPM) are low molecular weight biogenic amines distributed in all organisms. Their mechanism of action is based on their chemical and physical interactions with macromolecules such as DNA, RNA, acid phospholipids, and proteins (Tabour and Tabour 1984). In plant, PAs play important roles in defense against environmental stresses (Kotzabasis and Dornemann 1998, Legocka and Zajchert 1999, Sfichi et al. 2004). It has been observed that plants significantly increase the amount of various polyamines reaching a 900% raise of the SPD content in tobacco plants exposed to UV-B irradiation (Lütz et al. 2005). Also, it was shown that overexpression of spermidine synthase in *Arabidopsis* mutants improves tolerance to several stress conditions (Kasukabe et al. 2004). However, the precise role of PAs and the physiological significance of this increase remain unclear. Addition of exogenous PAs can prevent lipid peroxidation of thylakoid membranes thus retaining their structural integrity and avoid the release of the manganese stabilizing protein (MSP) of PSII and cytochrome *f* from the thylakoid membranes (Stoynova et al. 1999, Peters and Chin 2003). Moreover, exogenous application of SPD may stabilize the native structure of D1 and D2 proteins and cytochrome in oat plants in response to osmotic stress (Kusnetsov et al. 2006).

PAs differ not only in size but also in the number of positive charges at physiological pH (e.g. two in PUT, four in SPM). In order to examine the effect of positive charges of PAs during photoinhibition conditions, we added SPM, PUT or methylamine (MET) (one positive charge at physiological pH) to thylakoid membranes illuminated with strong white light. Water oxidation and the advancement of the S-states, the kinetics of Chl fluorescence rise, and electron transfer at both sides of PSII were affected. We concluded from the experimental data that SPM, which contains the greatest number of positive charges was able to limit the damage occurred by photoinhibition, compared to the other amines.

Results

In order to clarify the influence of amines on the thylakoid membranes illuminated with strong light, we measured the yield of oxygen evolution in thylakoid membranes using a train of 12 saturating single turn-over flashes. A periodicity of four in the yield of oxygen evolution is observed in relation of the advancement of the S-states of the OEC (Kok et al. 1970). Oxygen evolution was strongly declined in the photoinhibited samples and the oscillation pattern was slightly modified (Fig. 1, trace 5). A milder decrease of the oxygen yield was observed when 1 mM SPM was present during the strong illumination (Fig. 1, trace 2). However, the other amines used could not ameliorate the oxygen yield significantly (Fig. 1, traces 3, 4). A more general view is shown in the inset of figure 1 where the total yield of the first four flashes is represented. SPM added to the sample before photoinhibition clearly increased the oxygen yield compared to the photoinhibited sample without amines by about 45%. However, MET and PUT exhibited much weaker effects. These results indicate that SPM could partly prevent the damage occurred when thylakoids were exposed to excessive light.

To analyze further the action of amines added before photoinhibition, we analyzed the O-J-I-P induction traces that display the progressive reduction of the plastoquinones located at the acceptor side of PSII with three main phases corresponding to O-J, J-I, and I-P (Pospisil and Dau 2000, Zhu et al. 2005, Boisvert et al. 2006). Figure 2 (trace 4)

shows the damping of the Chl fluorescence induction in the control photoinhibited sample without amine. The decline of the amplitudes of O-J and I-P phases together with the simultaneous increase of Chl fluorescence at the start of the fluorescence induction (an approximation of F_0) is consistent with the photoinhibitory action of the strong illumination thus decreasing the maximum quantum yield of PSII, F_v/F_m , where $F_v = F_m - F_0$. Addition of 1 mM SPM before photoinhibitory illumination could partly prevent this damping (Fig. 2 trace 2). However, the addition of PUT or MET has no significant effect (Fig. 2, traces 3, 5). A more quantitative view is presented in the inset of figure 2 that shows the loss of F_v/F_0 , a parameter that accounts for the simultaneous variations in F_m and F_0 in determinations of the maximum quantum yield of PSII induced by strong illumination. Exogenously supplied SPM lead to significantly stronger F_v/F_0 compared to the other amines.

Thermoluminescence was also used to obtain further insight into the effect of amines on charge recombination processes in PSII under photoinhibition conditions. Figure 3 shows the TL glow curves supplied with a linear increase in temperature from 2°C to 62°C at the rate of 0.5°C/s following a single turn-over (1 μ s) white flash. The amplitude of TL signal reached a maximum at about 38°C in control thylakoid samples (Fig. 3, trace 1). This major TL emission, the B-band (30°C-40°C), originates from $S_2Q_B^-$ charge recombination (Sane 2004). This band was strongly decreased after photoinhibition treatment (Fig. 3, trace 5). Addition of 1 mM SPM before photoinhibition treatment increased the amplitude of the B-band of photoinhibited samples with a shift of the maximum toward lower temperatures (Fig. 3, trace 2). This shift may be explained by the heterogeneity in the population of PSII centers and their differential sensitivity toward photoinhibitory treatment. So, SPM may protect the population of PSII having a lower activation energy requirement for charge recombination. Moreover, 1 mM of MET added to the sample before photoinhibition treatment slightly increased the TL intensity (Fig. 3, trace 3). However, no significant modification of the B-band was observed after addition of 1 mM of PUT (Fig. 5, trace 4).

The above results show that only SPM, with the greatest number of positive charges, was able to protect PSII against photoinhibition conditions. To confirm the observed effect of SPM was due to the strength of the positive charges and not to molecular size, we compared SPM with two inorganic amines: 1,10-diaminodecane (DD) and decylamine (DA) which contain two and one positive charges, respectively, with the same number of carbon atoms (C10) as for SPM. Our results confirmed that only SPM with the greatest number of positive charges was able to increase F_v/F_m upon photoinhibition conditions (data not shown). In addition, spermidine (SPD) which has similar chemical structure to SPM with three positive charges was used to estimate its protective effect under photoinhibition conditions. The result showed a very similar effect compared to SPM (data not shown) indicating the polycationic nature is important for protection.

Chlorophyll fluorescence emission at 77 K was used to study the effect of amines on the association of LHCII antenna with the PSII core under photoinhibition conditions. At cryogenic temperature, two separate emission bands appear at 680 nm with a shoulder at 690 nm and 735 nm that originate from PSII and PSI, respectively (Bredenkamp and Baker 1990, Siffel et al. 2000). Figure 4 shows the fluorescence emission in thylakoid membranes normalized at 736 nm. After photoinhibition treatment the relative amplitude of the peak at 683 nm associated with PSII complexes strongly decreased (Fig. 4, trace 5). This result indicates the disconnection of LHCII antenna from the PSII complexes due to de-stacking. However, this change was completely abolished in the presence of the exogenous amines added before photoinhibition irrespective of the amine used (SPM, MET or PUT) (Fig. 4, traces 1-3). In that case, the traces were similar to the trace obtained from the control non-photoinhibited sample (Fig. 4, trace 4) showing the amines prevented the disconnection of LHCII from the PSII complexes.

As the protection against strong illumination was specific for SPM, F_v/F_m was measured to determine the effect of SPM on the time course of photoinhibition. Figure 5A shows that the effect of SPM increases according to time of photoinhibition. To gain

more information about the optimal concentration of exogenous SPM involved in photoprotection, F_v/F_m was measured at different concentrations of SPM added to the sample before photoinhibition. Figure 5B shows that the maximal activity of PSII was reached at around 0.5-1 mM of SPM.

To predict the site of binding of SPM on PSII, a docking experiment in which the polyamine was docked on PSII from *Thermosynechococcus elongates* was used. The docking results are shown in figure 6. Amongst the possible binding sites, the prediction suggested the preferred binding site of SPM on PSII is located at the hydrophilic loop of CP47 protein in the vicinity of PsbO protein (Fig. 6A). At this position, SPM is surrounded by Glu-1598, Asn-1599, Val-1601, Gly-710, Val-711 and Arg-692 residues in CP47 protein with a binding energy (ΔG) of $-6.56 \text{ Kcal mol}^{-1}$ (Fig. 6B). It is known that CP47 and PsbO proteins of cyanobacteria are very similar to their homologues in higher plants. Thus, the above suggests the interaction of SPM with the hydrophilic portion of proteins exposed to the lumen side of PSII would be involved in stabilizing the photosystem proteins against photoinhibition. The preferred binding site of PUT on PSII is located at D1 protein with a ΔG of $-7.32 \text{ Kcal mol}^{-1}$. However, MET is located at D2 protein with a ΔG of $-5.55 \text{ Kcal mol}^{-1}$ (data not shown).

Discussion

In this contribution we investigated the role of positive charges of polyamines in the protection of the photosynthetic apparatus upon photoinhibition conditions. Photoinhibition is known to affect both acceptor and donor sides of PSII causing a decrease of F_v/F_0 and the loss of oxygen evolution as shown here in Figs. 1 and 2. It was shown that the donor-side photoinhibition of PSII could be due to long lived and highly oxidative species, such as the oxidized tyrosine electron donor Tyr Z^+ and P680⁺ (Yamamoto 2001). The latter species can oxidize the surrounding amino acid residues of proteins, especially the D1 protein causing the damage to the RC of PSII (Nishiyama et al. 2006). On the other hand, the impairment of the OEC might facilitate the access of free oxygen molecules to P680, producing hydroxyl radicals (OH \cdot) and superoxide

radicals ($O_2^{\cdot-}$) that can also damage the reaction center (Pospisil et al. 2004). Photoinhibition is accompanied by the proteolytic degradation of D1 protein that follows an initial step induced by the generation of reactive oxygen species (ROS).

Photoinhibition of PSII could occur also on the acceptor side where $O_2^{\cdot-}$ is produced. In fact, under excessive illumination, the electron acceptor Q_B interacts with molecular oxygen to form $O_2^{\cdot-}$, which stimulates the degradation of D1 protein (Yamamoto et al. 2008). Moreover, the over-reduction of Q_A accompanied by its dissociation from its binding site might increase the probability for charge recombination between $P680^+$ and $Pheo^{\cdot-}$, leading to an enhancement of the formation of P680 triplet states. The latter interact with molecular oxygen to produce 1O_2 and consequently damage the D1 protein (Hideg et al. 1994). It has been suggested that both donor and acceptor side photoinhibition occurred even during *in vitro* conditions (Yamamoto 2001).

It is known that PAs play important roles in plant defense against environmental stresses (Kotzabasis and Dornemann 1998, Legocka and Zajchert 1999, Sfichi et al. 2004). It has been shown that changes in the PUT/SPM ratio caused by an increase or decrease in the level of endogenous PUT or SPM are responsible for the regulation of responses of the photosynthetic apparatus under various environmental stresses (Ioannidis and Kotzabasis 2007, Navakoudis et al. 2007, Yamaguchi et al. 2007, Demetriou et al. 2007). However, the effect of exogenous PAs added *in vitro* is incompletely understood. During our experiments we have observed that the addition of 1 mM of SPM could reduce the inhibition exerted by strong illumination. In fact, the yield of oxygen evolution, F_v/F_0 , and the B-band intensity were significantly increased compared to the photoinhibited sample without SPM (Figs 1, 2 and 3). However, PUT and MET did not protect the photosynthetic apparatus under similar conditions. This result clearly shows that SPM, with a higher net positive charge compared to PUT and MET, would be appropriate to stabilize the proteins of PSII under photoinhibition conditions. Indeed, other amines with the same number of carbon atoms as SPM but with less positive charges (DD and DA) were ineffective thus demonstrating that the

polycationic nature of SPM is required. Thus, the increased number of amino groups in SPM might enhance the PAs binding to proteins, providing the most stable conformation under photoinhibition conditions (Kusnetsov and Shevyakova 2007).

On the other hand, the detachment of LHCII antenna complexes from the PSII core under photoinhibition conditions is associated with the partial de-stacking of the thylakoid membranes known to occur during photoinhibition (Yamamoto et al. 2008). This detachment is known to be prevented in the presence of low concentration of inorganic cations such as Mg^{2+} or K^{+} due to the screening of surface charges on the LHCII proteins. Similar screening was shown here. The amines used all prevented the LHCII dissociation from PSII complexes (Fig. 4) showing the number of positive charges was not important for this rather non specific screening effect that differs from the photoprotective action of SPM.

Interestingly, Figure 5B shows the maximal activity of PSII in photoinhibited samples was reached at around 0.5-1 mM SPM. Above of this optimal concentration SPM might enhance the inhibitory effect of strong illumination. This is in good agreement with our previous studies which reported that high concentration of amines (SPM, PUT and MET) perturb the protein secondary structure in PSII-enriched submembrane fractions leading to a significant decrease in the percentage of α -helix with an increase of β -sheet. This modification is responsible for the drop of PSII activity (Hamdani and Carpentier 2009, Hamdani et al. 2009, Beauchemin et al. 2007).

Proposed mechanism of photoprotection by SPM

Our working hypothesis envisions that exogenously supplied SPM can stabilize the conformation of PSII proteins exposed to the hydrophilic media through electrostatic interaction owing to its polycationic nature. Polycations (poly(amino acid)s) were effectively shown to stabilize and even improve the photochemical activity of photosystems while negatively charged or hydrophobic poly(amino acid)s were ineffective (Matsumoto et al. 2010).

Exogenously added SPM, like other polyamines, can penetrate to the luminal side of thylakoid membranes as mentioned previously (Ioannidis et al. 2006, Beauchemin et al. 2007). This might occur through ion channels, especially Ca^{2+} permeable channels, which are efficiently modulated by this PA (Yamaguchi et al. 2007). At the luminal side, SPM may interact with hydrophilic fractions of proteins such as CP47 and the extrinsic polypeptides of the OEC, especially the PsbO protein, which is known as the manganese stabilizing protein (MSP), as suggested by our simulation (Fig. 6A). Consequently, PSII activity may be preserved under high light stress (Figs. 1, 2 and 3). The above proposal is strongly substantiated by recent investigations that proposed the OEC as the primary target of photoinhibition due to the initial inactivation of the Mn cluster following light absorption (Callahan et al. 1986, Jegerschold et al. 1990, Jegerschold and Styring 1991, Hakala et al. 2005, Murata et al. 2007). Moreover, it was also reported that the PsbO protein is oxidatively damaged under excessive illumination (Yamamoto et al. 2008). An extended structure of PsbO probably interacts with a large surface of the D1 protein, conferring protection against ROS and cationic radicals (Yamamoto 2001, Pospisil et al. 2004, Nishiyama et al. 2006, Yamamoto et al. 2008). Photoprotection of the luminal side of PSII may therefore be of physiological relevance. However, other potential binding sites for SPM maybe also present such as the acceptor side of PSII.

Materials and methods

Materials

SPM; SPD; PUT; MET; 1, 10-diaminodecane (DD) and decylamine (DA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St-Louise, MO) and used as supplied.

Thylakoid membranes preparation

Thylakoid membranes were isolated from fresh market spinach (*Spinacia oleracea* L.) as described elsewhere (Joly et al. 2005) and kept in the dark. Chl concentration was calculated following the procedure outlined in Porra et al. 1989.

Photoinhibitory treatment and amine addition

Thylakoid membranes (500 μg Chl/mL) were illuminated by an intense white light (2000 μmol of photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) from a 150 W quartz-halogen projector lamp for 30 min with continuous stirring at 24°C controlled by water-bath. The assay medium contained 250 mM sorbitol, 20 mM Tricine KOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 10 mM NaCl and 5 mM MgCl_2 . Before photoinhibition, 1 mM SPM, PUT or MET were added. The Chl content remained constant during the photoinhibitory treatment.

Oxygen evolution

Flash-induced oxygen evolution was measured in the thylakoid membranes (after treatment) at 22° C using a laboratory built instrument. A complete description of the oxygen electrode system can be found elsewhere (Zeinalov 2002). The electrode consists of two compartments separated by a cellophane membrane. The silver anode is filled by an electrolyte buffer containing 400 mM sucrose, 40 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 10 mM NaCl, and 5 mM MgCl_2 . Thylakoid membranes deposited in the cathode chamber were diluted to 200 μg Chl mL^{-1} in a medium containing 400 mM sucrose, 40 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 10 mM NaCl and 5 mM

MgCl₂ in the total volume of 90 µl. After a 5-min incubation, the sample was illuminated by a train of 12 saturating (4J) single turn-over flashes (10 µs). The quantitative estimation of photosynthetic oxygen production and the S-state transitions were measured using an analytical solution for the fitting of experimental data as described previously (Messinger et al. 1997).

Chl fluorescence induction

Fluorescence induction measurements were performed at room temperature using the Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK). The assay medium contained 250 mM sorbitol, 20 mM Tricine KOH (pH 7.8), 10 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ and 25 µg Chl mL⁻¹. Thylakoid membranes (after treatment) were excited with saturating red actinic light (655 nm and an intensity of 3000 µmol m⁻² s⁻¹) provided by light emitting diodes. As the fluorescence signal during the first 40 µs is ascribed to artifacts due to the response time of the instrument, these data were not included in the analyses of fluorescence induction traces. The signal at 40 µs was taken as F_0 , the initial fluorescence. Variable fluorescence, F_v (the difference between F_0 and the maximal fluorescence, F_m , in dark adapted samples), was used to calculate the F_v/F_m and F_v/F_0 ratios.

Fluorescence spectroscopy

Low temperature (77 K) spectra of fluorescence emission as well as their excitation spectra were measured with a Perkin-Elmer LS55 spectrofluorimeter. Chl fluorescence was excited at 436 nm during the measurements of emission spectra. The excitation and emission spectral widths were fixed at 5 and 2.5 nm, respectively. The Chl content of the sample was adjusted to 5 µg mL⁻¹.

Thermoluminescence (TL)

TL measurements were carried out with a laboratory built instrument. The description of the design and functional aspects are presented elsewhere (Ducruet 2003, Gauthier et al. 2006). Thylakoid membranes (after treatment) were diluted to 200 $\mu\text{g Chl mL}^{-1}$ in a medium containing 20 mM Tricine-NaOH (pH 7.8), 400 mM sucrose, 10 mM KCl, 10 mM NaCl and 5 mM MgCl_2 . About 200 μL of the suspension was added to the sample compartment (15 mm diameter) positioned just above the Peltier plate and covered with a Hellma 202-OS disc window. The sample chamber was closed with a holder bearing the light guide connected to the photomultiplier. The sequence of pre-incubation periods and flash illumination of thylakoid is presented below. First, samples were incubated for 120 s at 20°C in the dark. Following this step, the temperature was brought down to 2°C within 5-8 s and kept for 60 s. This incubation temperature was selected in order to avoid freezing induced damages to the OEC that may give rise to artefacts in thylakoid membranes without cryoprotectant (Gauthier et al. 2006). An actinic single turn over saturating white flash of about 1 μs width (setting 10, XE-STC, Walz, Germany) was applied to initiate charge separation in PSII. During the last step, linear warming of samples in total darkness activated the recombination of PSII charge pairs that can be detected by the appearance of emission bands with characteristic TL peak temperatures (Ducruet 2003, Gauthier et al. 2006).

Molecular modeling and docking

The docking studies were performed with ArgusLab 4.0.1 software (Planaria Software LLC; <http://www.arguslab.com>). PSII structure from *Thermosynechococcus elongatus* is drawn from coordinates obtained by Guskov et al. 2009; (PDB entry: 3BZ1) and the SPM three-dimensional structures was generated from PM3 semi-empirical calculations using Chem3D Ultra 6.0. The docking runs were performed on the ArgusDock docking engine using high precision with a maximum of 150 candidate poses. The conformations were ranked using the Ascore scoring function, which estimates the free binding energy. Upon docking of SPM to PSII, the current

configurations were optimized using a steepest decent algorithm until convergence, within 40 iterations, and amino acids residues within a distance of 3.5 Å relative to SPM were involved in the complexation.

Acknowledgments

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

References

- Adams, B.D. and Adams, W.W. (1992) Photoprotection and others responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 599–626.
- Allakhverdiev, S.I. and Murata, N. (2004) Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage–repair cycle of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1657: 23–32.
- Beauchemin, R., Gautier, A., Harnois, J., Boisvert, S., Govindachary, S. and Carpentier, R. (2007) Spermine and spermidine inhibition of photosystem II: disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from TyrZ to P680+ and the quinone acceptors Q_A⁻ to Q_B. *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 905–912.
- Boisvert, S., Joly, D. and Carpentier, R. (2006) Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics apparent activation energy and origin of each kinetic step. *FEBS J.* 273: 4770–4777.
- Bredenkamp, G.J. and Baker, N.R. (1990) Modification of excitation energy distribution to photosystem I by protein phosphorylation and cation depletion during thylakoid biogenesis in wheat. *Photosynth. Res.* 23: 111–117.
- Callahan, F.E., Becker, D.W. and Cheniae, G.M. (1986) Studies on the photoactivation of the water-oxidizing enzyme. *Plant Physiol.* 82: 261–269.
- Demetriou, G., Neonaki, C., Navakoudis, E. and Kotzabasis, K. (2007) Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus—The protective role of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 272–280.
- Ducruet, J.M. (2003) Chlorophyll thermoluminescence of leaf discs: simple instruments and progress in signal interpretation open the way to new ecophysiological indicators. *J. Exp. Bot.* 54: 2419–2430.

- Gauthier, A., Govindachary, S., Harnois, J. and Carpentier, R. (2006) Interaction of N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine with photosystem II as revealed by thermoluminescence: reduction of the higher oxidation states of the Mn cluster and displacement of plastoquinone from the Q_B niche. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 1547-1556.
- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A. and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9 Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 334-342.
- Hakala, M., Tuominen, I., Keränen, M., Tyystjärvi, T. and Tyystjärvi, E. (2005) Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 68-80.
- Hamdani, S. and Carpentier, R. (2009 a) Interaction of methylamine with extrinsic and intrinsic subunits of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1787: 1223-1229.
- Hamdani, S., Tajmir-Riahi, H.A. and Carpentier, R. (2009 b) Methylamine interaction with proteins of photosystem II: A comparison with biogenic polyamines. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 96: 201-206.
- Hideg, E., Spetea, C. and Vass, I. (1994) Singlet oxygen production in thylakoid membranes during photoinhibition as detected by EPR spectroscopy. *Photosynth. Res.* 39: 191-199.
- Ioannidis, N.E., Sfichi, L. and Kotzabasis, K. (2006) Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 821-828.
- Ioannidis, N.E. and Kotzabasis, K. (2007) Effects of polyamines on the functionality of photosynthetic membrane in vivo and in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 1372-1382.

Jegerschold, C., Virgin, I. and Styring, S. (1990) Light-dependent degradation of the D1 protein in photosystem II is accelerated after inhibition of the water splitting reaction. *Biochemistry* 29: 6179–6186.

Jegerschold, C. and Styring, S. (1991) Fast oxygen-independent degradation of the D1 reaction centre protein in photosystem II. *FEBS Lett.* 280: 87–90.

Joly, D., Bigras, C., Harnois, J., Govindachary, S. and Carpentier, R. (2005) Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes. *Photosynth. Res.* 84: 107–112.

Kasukabe, Y., He, L.X., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I. and Tachibana, S. (2004) Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45: 712–722.

Kok, B., Forbush, B. and McGloin, M. (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochem. Photobiol.* 11: 457–475.

Kotzabasis, K. and Dornemann, D. (1998) Differential changes in the photosynthetic pigments and polyamine content during photoadaptation and photoinhibition in the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*. *Z. Naturforsch. C* 53: 833–840.

Kuznetsov, V.V., Radyukhina N.L. and Shevyakova, N.I. (2006) Polyamines at stress: biological role, metabolism and regulation. *Russ. J. Plant Physiol.* 53: 658–684.

Kuznetsov, V.V. and Shevyakova, N.I. (2007) Polyamines and Stress Tolerance of Plants. *Plant Stress* 1: 50–71.

Legocka, J. and Zajchert, I. (1999) Role of spermidine in the stabilization of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II during leaf senescence process. *Acta Physiol. Plant.* 21: 127–132.

- Lütz, C., Navakoudis, E., Seidlitz, H.K. and Kotzabasis, K. (2005) Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. *Biochim. Biophys. Acta* 1710: 24–33.
- Mathis, P., Satoh, K. and Hansson, O. (1989) Kinetic evidence for the function of Z in isolated photosystem II reaction centers. *FEBS Lett.* 251: 241–244.
- Matsumoto, K., Zhang, S. and Koutsopoulos, S. (2010) Enhanced electron transfer activity of photosystem I by polycations in aqueous solution. *Biomacromolecules* 11: 3152–3157.
- Melis, A. (1999) Photosystem II damage and repair cycle in chloroplast: what modulates the rate of photodamage in vivo. *Trends Plant Sci.* 4: 130–135.
- Messinger, J., Seaton, G., Wydrzynski, T., Wacker, U. and Renger, G. (1997) S-3 state of the water oxidase in photosystem II. *Biochemistry* 36: 6862–6873.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. and Allakhverdiev, S.I. (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 414–421.
- Nanba, O. and Satoh, K. (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 109–112.
- Navakoudis, E., Vrentzou, K. and Kotzabasis, K. (2007) A polyamine- and LHCII protease activity-based mechanism regulates the plasticity and adaptation status of the photosynthetic apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 261–271.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I. and Murata, N. (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 742–749.

- Ohnishi, N., Allakhverdiev, S.I., Takahashi, S., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y. and Murata, N. (2005) Two-Step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry* 44: 8494–8499.
- Peters, J.S. and Chin, C.K. (2003) Inhibition of photosynthetic electron transport by palmitoleic acid is partially correlated to loss of thylakoid membrane proteins. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 117–124.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384–394.
- Pospisil, P. and Dau, H. (2000) Chlorophyll fluorescence transients of photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth. Res.* 65: 41–52.
- Pospisil, P., Arato, A., Liskay, A.K. and Rutherford, A.W. (2004) Hydroxyl radical generation by photosystem II. *Biochemistry* 43: 6783–6792.
- Powles, S.B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 15–44.
- Sane, P.V. (2004) Thermoluminescence: A technique for probing photosystem II. In *Photosynthesis Research Protocols*. Edited by Carpentier, R. pp. 229–248. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Sfichi, L., Ioannidis, N. and Kotzabasis, K. (2004) Thylakoid-associated polyamines adjust the UV-B sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of light-harvesting complex II changes. *Photochem. Photobiol. B* 80: 499–506.

Siffel, P., Hunalov, I. and Rohacek, K. (2000) Light-induced quenching of chlorophyll fluorescence at 77 K in leaves, chloroplasts and Photosystem II particles, *Photosynth. Res.* 65: 219–229.

Sproviero, E.M., Gascon, J.A., McEvoy, J.P., Brudvig, G.W. and Batista, V.S. (2008) Quantum mechanics/molecular mechanics study of the catalytic cycle of water splitting in photosystem II. *J. Am. Chem. Soc.* 130: 3428–3442.

Stoynova, E.Z., Karanov, E. and Alexieva, V. (1999) Subcellular aspects of the protective effect of spermine against atrazine in pea plants. *Plant Growth Regul.* 29: 175–180.

Styring, S., Virgin, I., Ehrenberg, A. and Andersson, B. (1990) Strong light photoinhibition of electron transport in photosystem II. Impairment of the functions of the first quinone acceptor, QA. *Biochim. Biophys. Acta* 1015: 269–278.

Tabour, C. W. and Tabour, H. (1984) Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 749–790.

Tyystjarvi, E. (2008) Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coord. Chem. Rev.* 252: 361–376.

Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E. M. and Andersson, B. (1992) Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II. Stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1102: 195–201.

Yamamoto, Y. (2001) Quality control of photosystem II. *Plant Cell. Physiol.* 42: 121–128.

Yamamoto, Y., Aminaka, R., Yoshioka, M., Khatoon, M., Komayama, K., Takenaka, D., Yamashita, A., Nijo, N., Inagawa, K., Morita, N., Sasaki, T. and Yamamoto, Y. (2008) Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. *Photosynth. Res.* 98: 589–608.

Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Takahashi, T., Michael, A.J. and Kusano, T. (2007) A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352: 486–490.

Zeinalov, Y. (2002) An equipment for investigations of photosynthetic oxygen production reactions. *Bulg. J. Plant Physiol.* 28: 57–67.

Zhu, X.G., Govindjee, N.R., Bakereric, D., Ort, D.R. and Stephen, P.L. (2005) Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with photosystem II. *Planta* 223: 114–133.

Zsiros, O., Allakhverdiev, S.I., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y. and Murata, N. (2006) Very strong UV-A light temporally separates the photoinhibition of photosystem II into light-induced inactivation and repair. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 123–129.

Figure legend

Figure 1

Period-four oscillation of the yield of oxygen evolution in thylakoid membranes using a train of 12 saturating (4J) single turn-over flashes (10 μ s): (1) control; (2) PI + SPM; (3) PI + MET; (4) PI + PUT and (5) PI without amine. Assays were carried out in media containing 400 mM sucrose, 40 mM Hepes-NaOH (pH 7.6), 10 mM NaCl, and 5 mM $MgCl_2$. Details are given in Materials and methods. (Inset) Effects of photoinhibition in the presence of various amines on the yield of oxygen evolution in thylakoid membranes. Each point represents the total yield of the first four flashes from the experiment of Fig. 1. PI, photoinhibited; SPM, spermine; PUT, putrescine; MET, methylamine.

Figure 2

Chl fluorescence induction traces of thylakoid membranes photoinhibited with 1 mM of SPM, PUT or MET: (1) control; (2) PI + SPM; (3) PI + PUT; (4) PI without amine; (5) PI + MET. (Inset) Chl fluorescence parameter F_v/F_0 measured in thylakoid membranes photoinhibited with or without 1 mM of SPM, PUT or MET. See details in Materials and methods.

Figure 3

Thermoluminescence glow curves (B-band) from thylakoid membranes after photoinhibition in the presence of different amines: (1) control without amine; (2) PI + SPM; (3) PI + MET; (4) PI + PUT; (5) PI without amine. The samples were heated from 2°C to 62°C at a rate of 0.5°C/s.

Figure 4

Fluorescence emission spectra measured in isolated thylakoids at 77 K: (1) PI +SPM; (2) PI + PUT; (3) PI + MET; (4) control without amine; (5) PI without amine. All traces were normalized to 736 nm. These traces are the average of 6-9 assays.

Figure 5

(A) Chl fluorescence parameter F_v/F_m measured in thylakoid membranes with and without 1 mM of SPM at different time of photoinhibition: (full line) PI without amine; (dashed line) PI+SPM. (B) Effect of increasing SPM concentration in thylakoid membranes photoinhibited for 30 min on the Chl fluorescence parameter F_v/F_m .

Figure 6

(A) Best conformation for SPM docked to the PSII structure from *Thermosynechococcus elongatus* (PDB entry 3BZ1). Arrow indicates the location of SPM. (B) CP47 residues in the vicinity of SPM ($< 3.5 \text{ \AA}$) and the free binding energy (ΔG) of the docked complex. Dashed line: H-bonding.

Figure 1

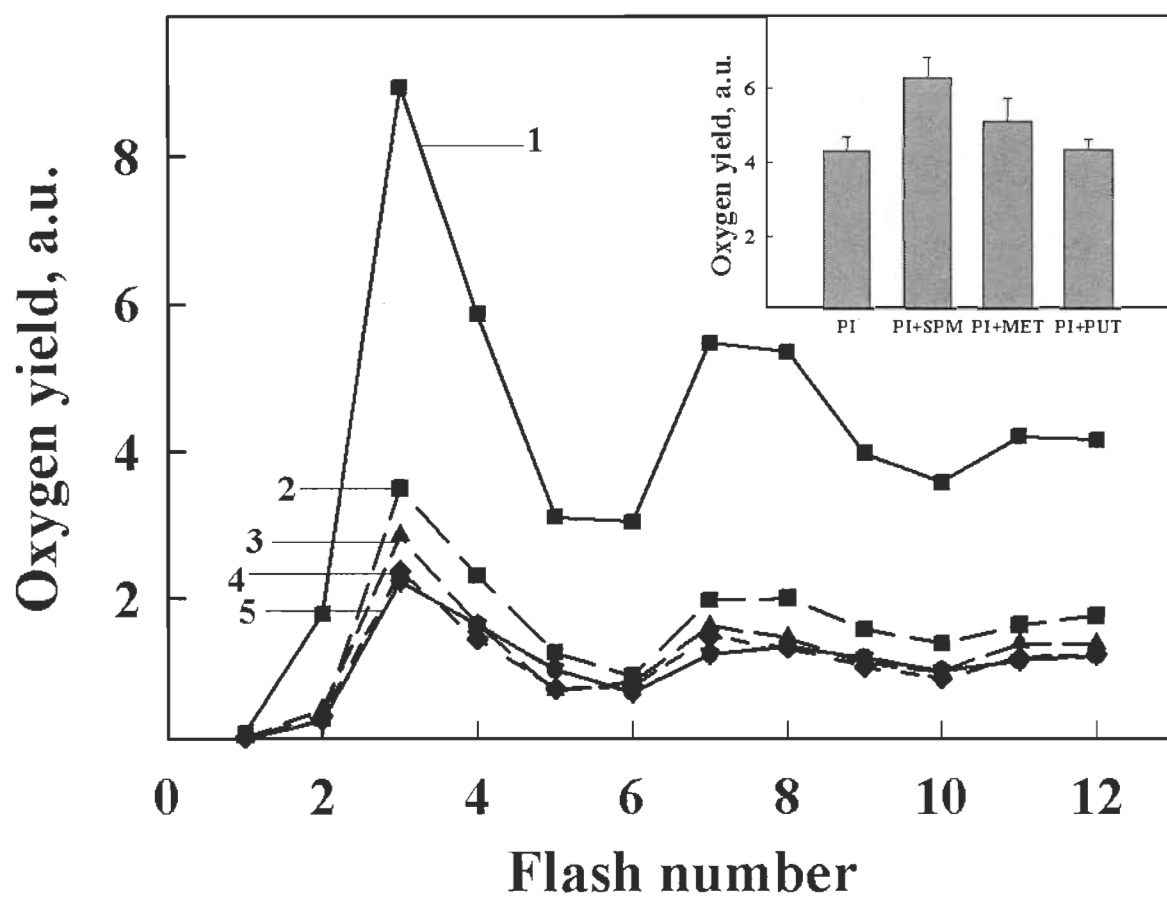


Figure 2

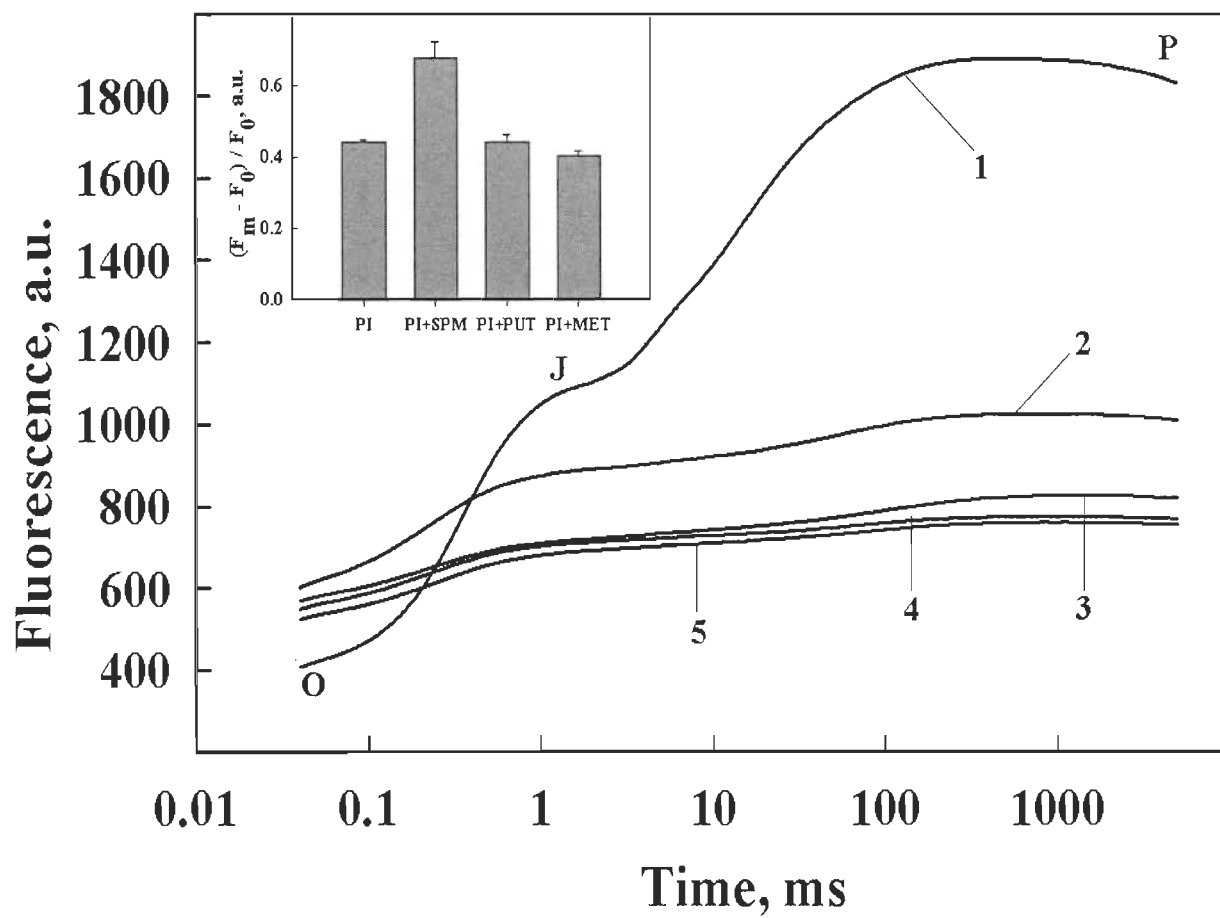


Figure 3

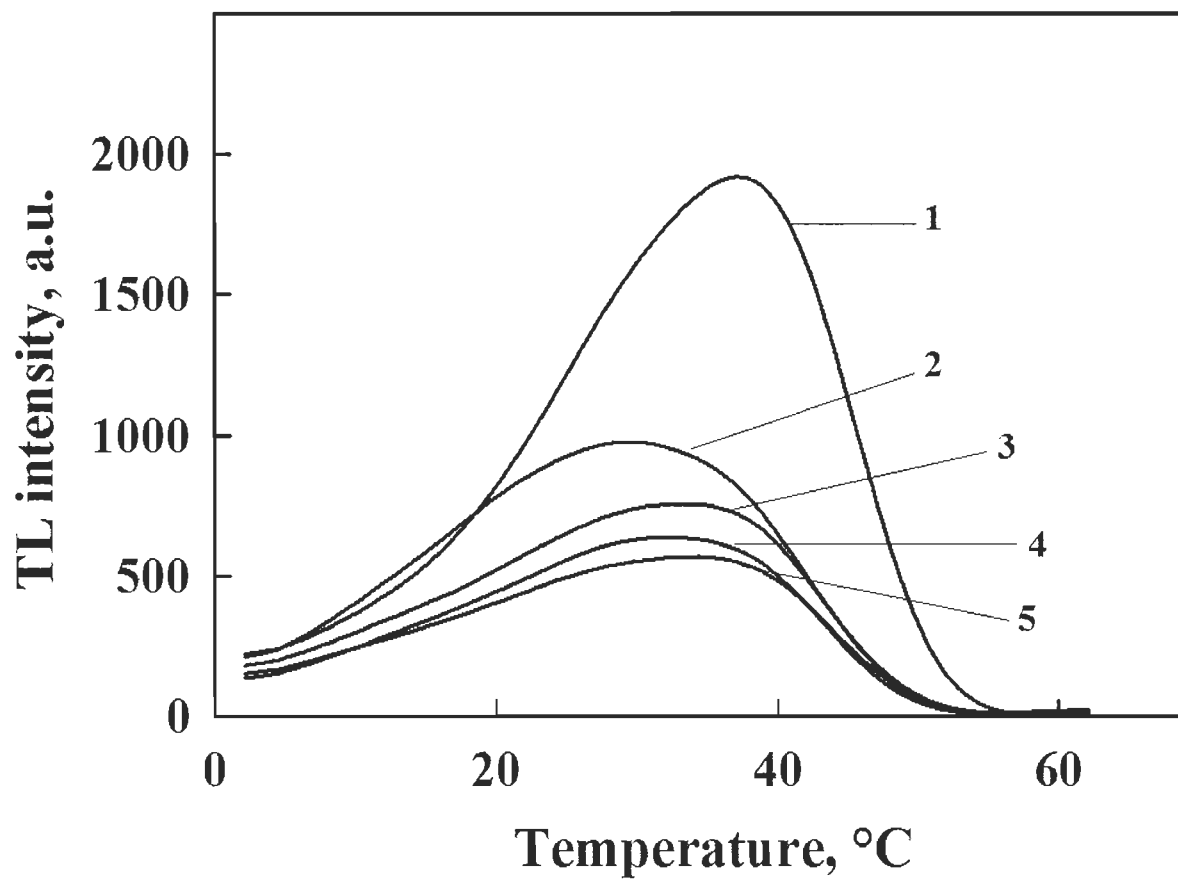


Figure 4

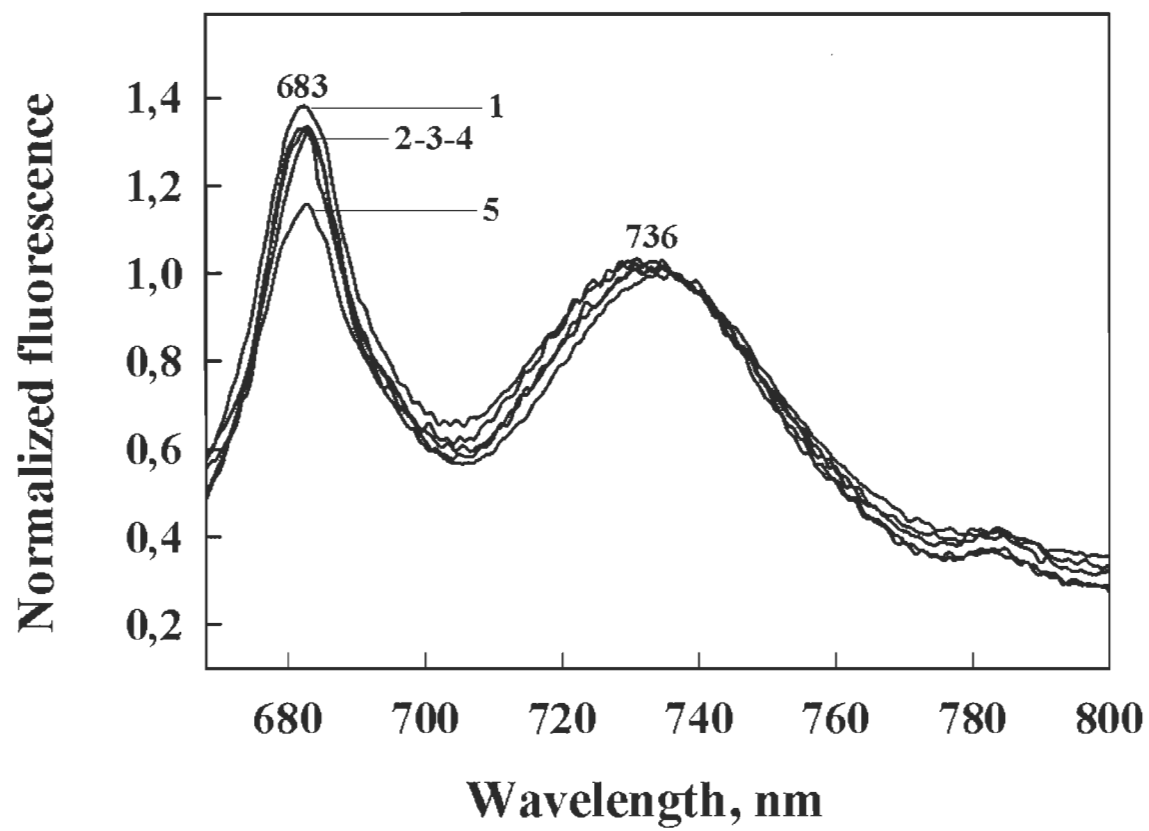


Figure 5

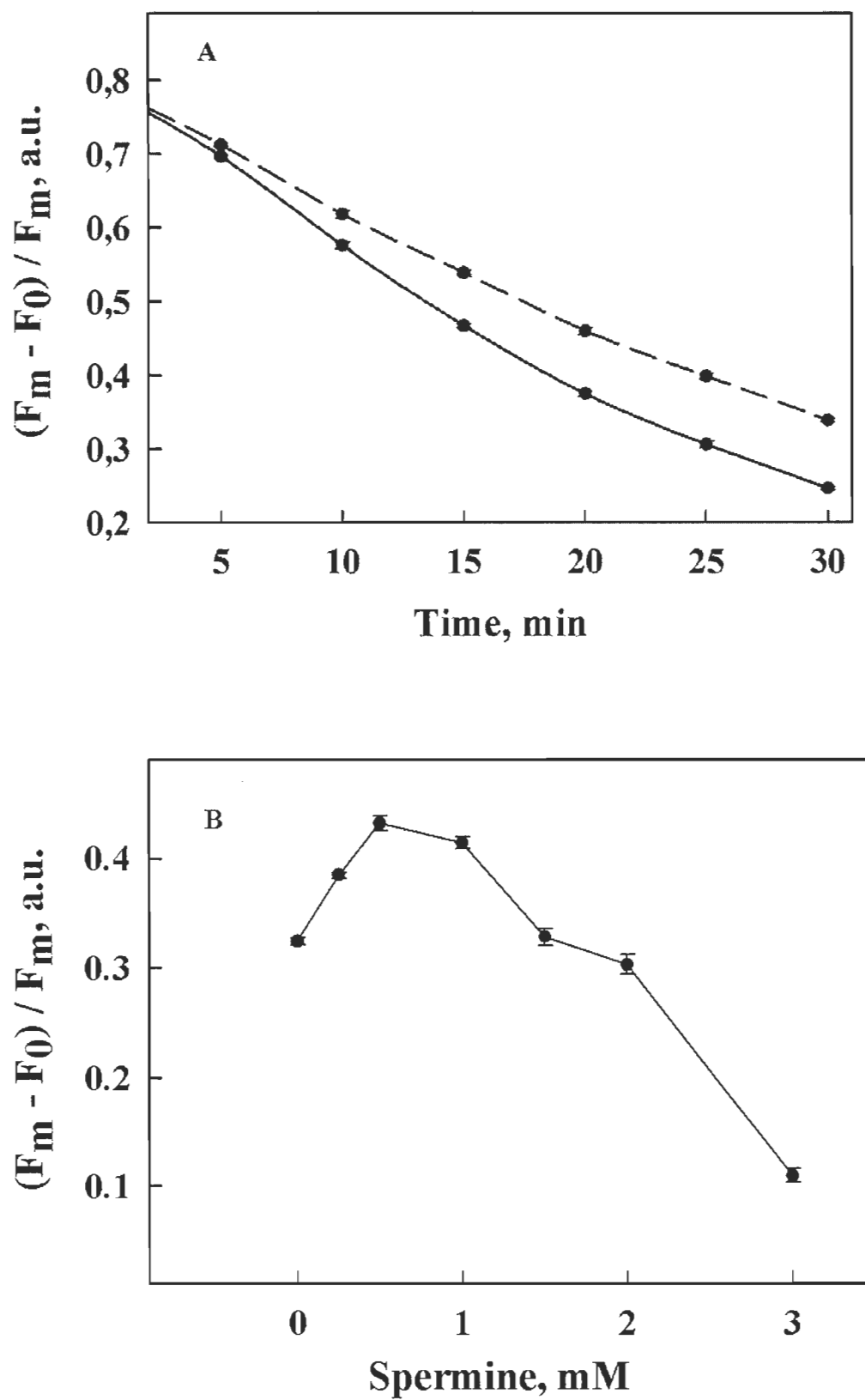
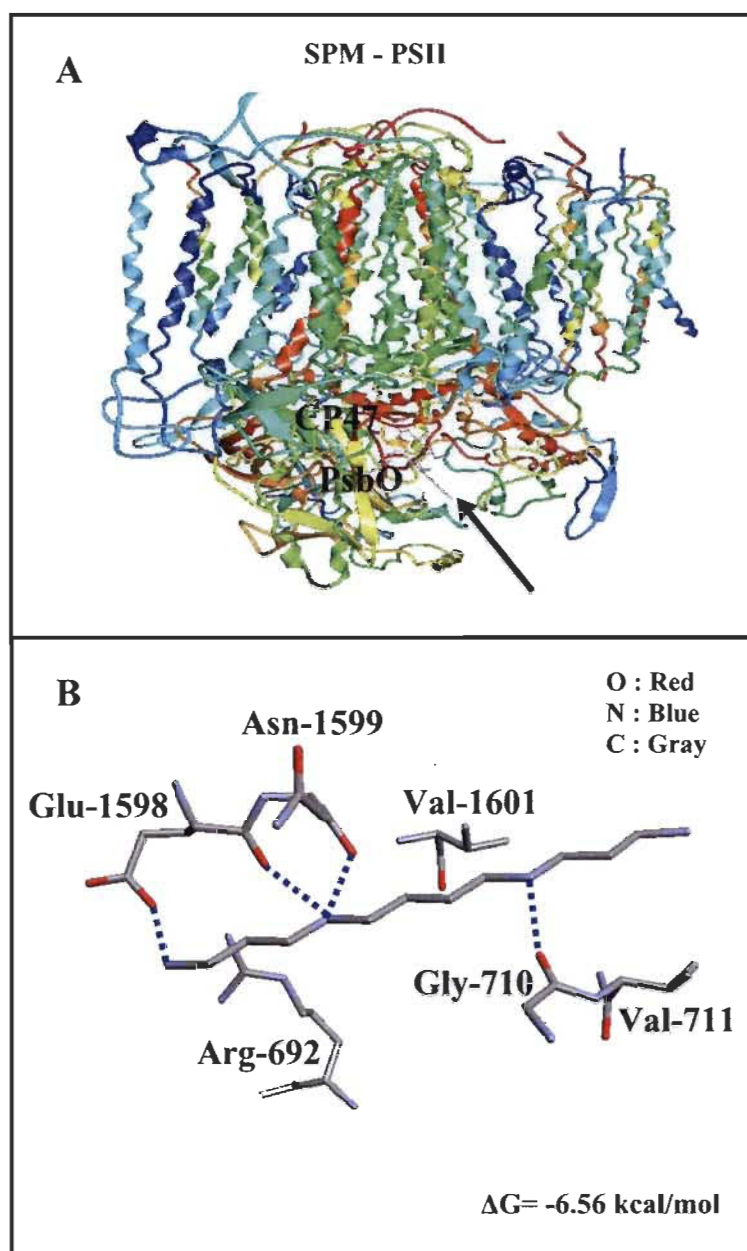


Figure 6



CHAPITRE VI

INTERACTION OF SPERMINE WITH PROTEIN SUBUNITS CONFERS GREATER PROTECTION OF PHOTOSYSTEM I COMPARE TO PHOTOSYSTEM II AGAINST PHOTOINHIBITION

Le contenu de ce chapitre (court article) a été soumis pour publication en 2011 au journal, *Biochemistry*: Hamdani, S., Essemine, J., Carpentier, R., Interaction of spermine with protein subunits confers greater protection of photosystem I compare to photosystem II against photoinhibition.

Résumé

Le but spécifique de cette étude est de mieux élucider le rôle de charges positives des amines (SPM, PUT et MET) dans la protection des photosystèmes (PSII et PSI) contre la photoinhibition, moyennant différentes techniques spectroscopiques. Pour cela, la membrane de thylakoïdes isolée a été traitée par une lumière de forte intensité, à 24 °C durant 30 min, afin de provoquer la détérioration des photosystèmes. Les résultats obtenus ont montré que l'induction de la fluorescence ainsi que la photooxydation de P700 ont été affectées dans les échantillons témoins photoinhibés. Après l'addition de 1 mM de SPM avant la photoinhibition, l'activité des photosystèmes a augmenté par $\pm 40\%$ pour le PSII et $\pm 150\%$ pour le PSI, alors que l'effet des amines (PUT et MET) n'a pas été significatif. Cette protection est probablement due à la force des charges positives de la SPM, qui peuvent stabiliser la conformation des protéines des photosystèmes via des interactions électrostatiques avec leurs parties hydrophiles.

**Interaction of spermine with protein subunits confers greater protection of
photosystem I compare to photosystem II against photoinhibition**

Saber Hamdani¹, Jemâa Essemine^{1,2} and Robert Carpentier^{1*}

¹Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières,
Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

²Plant Biology and Biotechnology Laboratory, Sciences Faculty of Tunis, 1060. Tunisia

*Author for correspondence (E-mail: Robert.Carpentier@uqtr.ca. Phone: 1-819-376-
5011 ext.3300. Fax: +1-819-376-5057)

Abstract

The protection of photosystems against light stress by spermine (SPM), putrescine (PUT) and methylamine (MET) were investigated in isolated thylakoid membranes. Under photoinhibitory treatment at 24°C the kinetics of Chl fluorescence rise and P700 photooxidation were affected. SPM added before photoinhibition led to a significant increase in both PSII and PSI activities by about 40% and 150% respectively, compared to the photoinhibited sample without amine. This protection can be provided by the strength of the positive charges of SPM, which can interact with surface exposed membrane proteins of PSI and PSII thus stabilizing their conformation against photoinhibition.

Key words: Photoinhibition; Photosystems; Spermine; Thylakoid membranes.

[†] This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Abbreviations: Chl, chlorophyll; FI, chlorophyll fluorescence induction; F_o , basal level of chlorophyll fluorescence; F_m , maximal level of chlorophyll fluorescence; F_v , variable chlorophyll fluorescence; LHC, light harvesting complex; OEC, oxygen-evolving complex; PI, photoinhibited sample; PsbO, extrinsic protein of PSII.

Introduction

When plants are exposed to high light intensities their photosynthetic activity declines. This drop is caused by the imbalance between the rate of absorption of light energy and the rate of consumption of CO₂ (1). Photosystem II (PSII) is considered as the most sensitive photosystem to photoinhibition *in vivo* (2). The latter affects both the acceptor and donor side of PSII, leading to degradation of the D1 reaction center protein and the light-harvesting complex (LHCII) (3). The deleterious effects are associated with the generation of reactive oxygen species (ROS) under light stress (4). Several recent studies have reported that PSI can also be targeted by photoinhibition *in-vivo*, especially under chilling conditions (5-7). The mechanism of damage to PSI starts from oxidative degradation to the iron-sulfur proteins F_A and F_B, which are bound in the PSI-C protein causing the dissociation of stromal subunits from PSI (8). Light stress at room temperature also causes specific damage to LHCI due to ROS (9,10).

Plants cope with and adapt to photoinhibition by appropriate physiological, developmental and biochemical responses. It has been observed that plants significantly increase the amount of various polyamines (PAs), such as putrescine (PUT), spermidine (SPD) and spermine (SPM) reaching 900% of SPD in tobacco plants exposed to UV-B irradiation (11). However, the precise role of PAs and the physiological significance of this increase remain unclear. Addition of exogenous SPM in pea plant can prevent lipid peroxidation of thylakoid membranes and avoid the release of the PsbO protein of PSII as a response to atrazine (12). The mechanism of action of PAs is based on their chemical and physical interactions with macromolecules such as DNA, RNA, acid phospholipids and proteins (13).

PAs differ in the number of positive charges at physiological pH (e.g. two in PUT, four in SPM). In order to examine the effect of positive charges of PAs during photoinhibition conditions, we added SPM, PUT or methylamine (MET) (one positive charge at physiological pH) to thylakoid membranes illuminated with strong white light at 24°C. The kinetics of Chl fluorescence rise and P700 photooxidation were affected.

We concluded from the experimental data that SPM, which contains the greatest number of positive charges is able to limit the damage occurred by photoinhibition, compared to the other amines. This protection, shown here for the first time, can be provided by electrostatic interaction of SPM with membrane polypeptides exposed to both luminal and stromal sides of PSI and PSII, stabilizing the proteins under photoinhibition conditions.

Materials and methods

Thylakoid membranes preparation

Thylakoid membranes were isolated from fresh market spinach (*Spinacia oleracea* L.) as described elsewhere (14) and kept in the dark. Chl concentration was calculated following the procedure outlined in Porra et al. (15).

Photoinhibitory treatment and amine addition

Thylakoid membranes (500 μg Chl/mL) were illuminated by an intense white light (2000 μmol of photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 30 min with continuous stirring at 24°C controlled by water-bath. Before photoinhibition, 1 mM SPM, PUT or MET were added.

Chl fluorescence induction (FI)

FI measurements were performed at 24°C using the Plant Efficiency Analyser (Hanasatech, King' Lynn, Norfolk, UK). The assay medium contained 20 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 and 25 μg Chl mL^{-1} . Thylakoid membranes (after treatment) were excited with saturating red actinic light (655 nm and an intensity of 3000 $\mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by light emitting diodes.

Redox state of P700

P700 Photooxidation was monitored at 24°C as light-induced absorbance changes at 820 nm (ΔA_{820}) using the ED-P700DW connected via a PAM-101 fluorometer (Walz). The ED-P700DW dual wavelength emitter detector unit detects strictly the differential absorbance changes (810 nm minus 860 nm) peaking at a single wavelength band 820 nm ascribed for the P700⁺ radical absorption and removes the plastocyanin absorbance changes. FR-light (70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was obtained by passing the beam from a Filtre-Lite light source (Microview, Thornhill, ON, Canada) through a RG-9 filter (Schott, Mainz, Germany). The assay medium contained 20 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ and 500 $\mu\text{g Chl mL}^{-1}$. The measurements were performed in the presence of 100 μM DCMU to avoid reduction of P700 by linear electron flow coming from PSII during measurements and 50 μM methyl viologen to prevent charge recombination between P700⁺ and reduced acceptor side.

Results

In vitro experiments were performed to study the influence of PAs on the thylakoid membranes illuminated with strong light at 24°C. A protective action against photoinhibition in both PSII and PSI is shown here using two well characterized specific photoreactions of the thylakoid membrane.

PSII activity was probed using the polyphasic Chl fluorescence induction. These traces with three main phases corresponding to OJ, JI, and IP display the progressive reduction of the plastoquinones located at the acceptor side of PSII (Fig. 1 trace 1) (16). Figure 1 (trace 3) shows the damped FI trace obtained from the photoinhibited sample (PI) without amine. Addition of 1 mM SPM before photoinhibitory illumination could restore significantly the kinetics of Chl fluorescence (Fig. 1, trace 2). However, the addition of PUT or MET had no significant effect (Fig. 1, traces 4, 5). For a better quantification, inset shows the decline of the maximal fluorescence yield, F_v/F_m , where $F_v = F_m - F_0$, induced by the excessive illumination. Addition of SPM led to an increase of F_v/F_m by about 40% compared to PI without amines. This protection could be provided

by the interaction of SPM with portions of proteins exposed to both luminal and stromal sides of PSII, such as the PsbO, D1 and LHCII.

To confirm the observed effect of SPM was due to the strength of the positive charges and not to carbon chain length, we compared SPM with two inorganic amines: diaminodecane (DD) and decylamine (DA) which contain two and one positive charges, respectively, with the same number of carbon atoms (C10) as for SPM. Our results confirmed that only SPM with the greatest number of positive charges was able to increase F_v/F_m upon photoinhibition conditions (Fig. 2).

The protection by amines added before photoinhibition in PSI was characterized by measurements of P700 photooxidation kinetics with FR-light, which stimulate preferentially PSI. Figure 3 (trace 1) shows a fast photooxidation phase, which occurred within 1 s, followed by a prolonged steady-state. This trace obtained in the presence of DCMU and MV represents the maximal photooxidizable PSI population. The level of photooxidizable P700 without amine was significantly declined in PI compared to the control, showing the photoinhibitory damage to PSI expected in isolated thylakoid membranes (Fig. 3, trace 4). Exogenous SPM added before photoinhibitory illumination increased considerably the P700 photooxidation level compared to PI without amine, even though the steady-state was not reached even after 10 s (Fig. 3, trace 2). Furthermore, MET and PUT exhibited much weaker effects (Fig. 3, traces 3, 5). The amount of photooxidizable P700 is quantified in inset. The level of P700⁺ in PSI increased by about 150% with the addition of 1 mM of SPM before treatment, compared to PI without amine. This supports the idea that SPM greatly enhanced the stability of PSI under photoinhibition conditions. Importantly, addition of SPM after photoinhibitory treatment did not reverse the effect of photoinhibition (data not shown).

Discussion

In this study, we investigated the role of the positive charges of PAs in the protection of the photosynthetic apparatus upon photoinhibition conditions. A large number of studies have reported the sensitivity of both acceptor and donor sides of PSII to photodamage occurred by excessive illumination (17,18). It was shown that the donor-side photoinhibition of PSII could be due to long lived and highly oxidative species, such as the oxidized tyrosine electron donor Tyr Z^+ and $P680^+$ (18). These species can oxidize some proteins of PSII, such as the D1 and PsbO, thus initiating further damage of the RC (19). It was suggested that the above proteins are also affected by ROS generated following photoinhibition conditions (20). This initial action of oxidizing species is reported essential for the initial conformational change of the D1 protein leading to further attack by proteases (4). We have observed that the addition of 1 mM SPM could reduce the inhibition of PSII exerted by strong illumination. In fact, F_v/F_m was clearly increased compared to PI without SPM (Fig. 1). However, DA, DD, PUT and MET did not protect the photosystem under similar conditions. These results clearly show that SPM, with a higher net positive charge compared to other amines, would be appropriate to confer partial stabilization to the proteins of PSII under photoinhibition conditions.

In PSI, the attack of ROS generated during strong illumination targets the exposed polypeptides of the stromal side of the photosystem starting with the degradation of the iron-sulfur complexes F_A and F_B bound in the PSI-C protein (9,21,22). LHCI is also affected and part of the damping of PSI activity during photoinhibition is likely related to the dissociation of LHCI antenna from the PSI core (10,22). Several studies indeed suggested that LHCI is damaged first during PSI photoinhibition, especially at room temperature when LHCI could be more susceptible to excess light (23,24).

During our experiments, we have observed that the addition of 1 mM SPM before photoinhibitory treatment could reduce considerably the inhibition of PSI activity occurred by strong illumination (Fig. 3, trace 2). Our working hypothesis suggests that the protective effect was provided by the electrostatic interaction of SPM with surface

exposed polypeptides of LHCI and/or PSI core. This interaction could help maintaining protein conformation and consequently the PSI activity could be preserved under photoinhibition conditions. This is in line with the recently reported stabilization of PSI in its active form with poly(amino acid)s polycations while negatively charged or hydrophobic poly(amino acid)s were ineffective (25).

Interestingly, the beneficial effect of SPM in PSI was more enhanced than in PSII under photoinhibitory treatment. This result could be explained by the easier access of SPM to the PSI polypeptides as this photosystem is located exclusively in the unstacked thylakoid membranes. However, PSII complexes and the associated LHCII are abundant in the stacked grana, where the access of SPM might be limited. The strong protection observed for PSI suggests that PAs, especially SPM, could efficiently stabilize protein conformation against oxidative damage *in vivo*. This would explain why PSI is more resistant to photoinhibition than PSII *in vivo* and why PSI is much more sensitive in isolated thylakoid membranes compare to *in vivo*.

References

- (1) Powles, S. B. (1984) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 15–44.
- (2) Tyystjarvi, E. (2008) *Coord. Chem. Rev.* 252, 361–376.
- (3) Aro, E. M., Virgin, I., and Andersson, B. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1143, 113–134.
- (4) Yamamoto, Y., Aminaka, R., Yoshioka, M., Khatoon, M., Komayama, K., Takenaka, D., Yamashita, A., Nijo, N., Inagawa, K., Morita, N., Sasaki, T., and Yamamoto, Y. (2008) *Photosynth. Res.* 98, 589–608.
- (5) Tjus, S. E., Moller, B. L., and Scheller, H. V. (1998) *Plant Physiol.* 116, 755–764.
- (6) Terashima, I., Funayama, S., and Sonoike, K. (1994) *Planta* 193, 300–306.
- (7) Sonoike, K., and Terashima, I. (1994) *Planta* 194, 287–293.
- (8) Oh, M. H., Safarova, R. B., Eu, Y. J., Zulfugarov, I. S., Kim, J. H., Hwang, H. J., Lee, C. B., and Lee, C.H. (2009) *Photochem. Photobiol. Sci.* 8, 535–541.
- (9) Hui, Y., Jie, W., and Carpentier, R. (2000) *Photochem. Photobiol.* 72, 508–512.
- (10) Hwang, H. J., Kim, J. H., Eu, Y. J., Moon, B. Y., Cho, S. H., and Lee, C. H. (2004) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 73, 79–85.
- (11) Lütz, C., Navakoudis, E., Seidlitz, H. K., and Kotzabasis, K. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* 1710, 24–33.
- (12) Stoyanova, E. Z., Karanov, E. N., and Alexieva, V. (1999) *Plant Growth Regul.* 29, 175–180.
- (13) Tabour, C. W., and Tabour, H. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53, 749–790.

- (14) Joly, D., Bigras, C., Harnois, J., Govindachary, S., and Carpentier, R. (2005) *Photosynth. Res.* 84, 107–112.
- (15) Porra, R. J., Thompson, W. A., and Kriedemann, P. E. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 975, 384–394.
- (16) Boisvert, S., Joly, D., and Carpentier, R. (2006) *FEBS J.* 273, 4770–4777.
- (17) Rivas, J. D., Andersson, B., and Barber, J. (1992) *FEBS Lett.* 301, 246–252.
- (18) Jegerschold, C., Virgin, I., and Styring S. (1990) *Biochemistry* 29, 6179–6186.
- (19) Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., and Murata, N. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 742–749.
- (20) Pospisil, P., Arato, A., Liskay, A. K., and Rutherford, A. W. (2004) *Biochemistry* 43, 6783–6792.
- (21) Jakob, B., and Heber, U. (1996) *Plant Cell. Physiol.* 37, 629–635.
- (22) Scheller, H. V., and Haldrup, A. (2005) *Planta* 221, 5–8.
- (23) Rajagopal, S., Bukhov, N. G., and Carpentier, R. (2003) *Photochem. Photobiol.* 77, 284–291.
- (24) Alboresi, A., Ballottari, M., Hienerwadel, R., Giacometti, G. M., and Morosinotto, T. (2009) *BMC Plant Biol.* 9, 1–14.
- (25) Matsumoto, K., Zhang, S., and Koutsopoulos, S. (2010) *Biomacromolecules* 11, 3152–3157.

Figure legend

Figure 1

Chl fluorescence induction traces of control or photoinhibited thylakoid membranes with 1 mM of SPM, PUT or MET: (1) control; (2) PI + SPM; (3) PI without amine; (4) PI + PUT; (5) PI + MET. (Inset) Chl fluorescence parameter F_v/F_m measured in control or photoinhibited thylakoid membranes with or without 1 mM of SPM, PUT or MET (see details in materials and methods).

Figure 2

Chl fluorescence parameter F_v/F_m measured in control or photoinhibited thylakoid membranes with or without 1 mM of SPM, diaminodecane (DD) or decylamine (DA).

Figure 3

Original traces of the FR-light (10 s) induced photooxidation of P700 monitored as absorbance changes at 820 nm in control isolated thylakoid membranes (trace 1), PI with 1 mM SPM (trace 2), PI without amine (trace 3), PI with 1 mM PUT (trace 4), or PI with 1 mM MET (trace 5). The upward arrow indicates the FR-light on. (Inset) Changes in the photooxidation level of P700 detected as the relative amplitudes of FR-light induced absorbance changes at 820 nm in isolated thylakoid membranes. Each value is the average \pm SE of around 12 measurements.

Figure 1

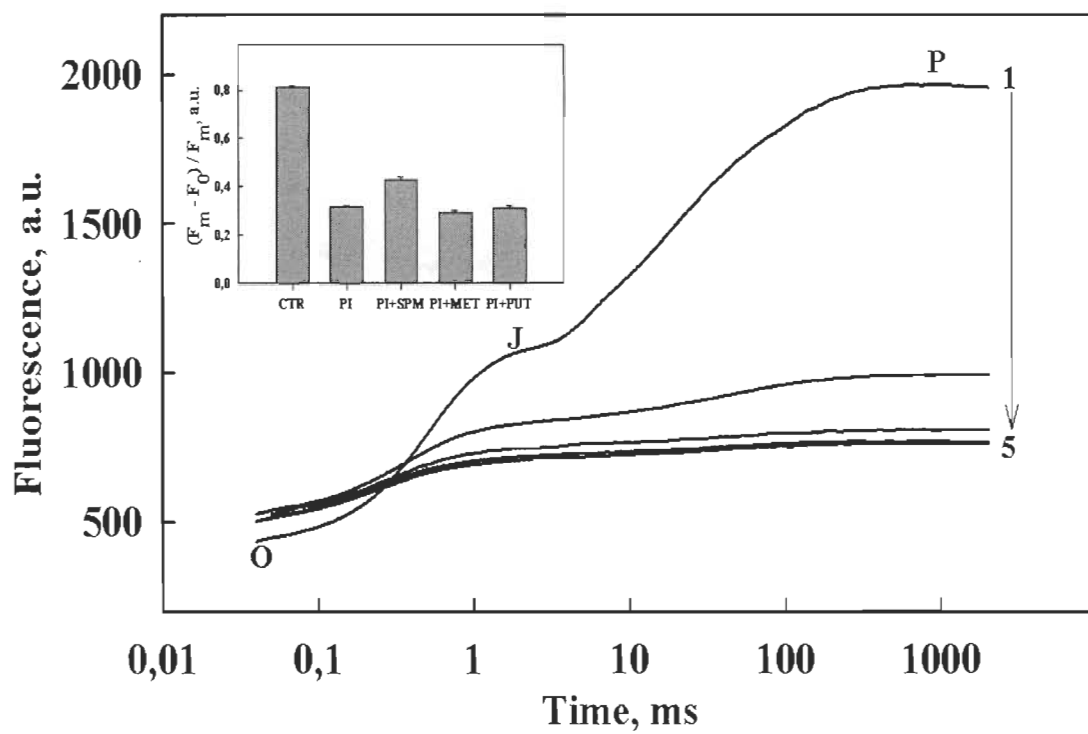


Figure 2

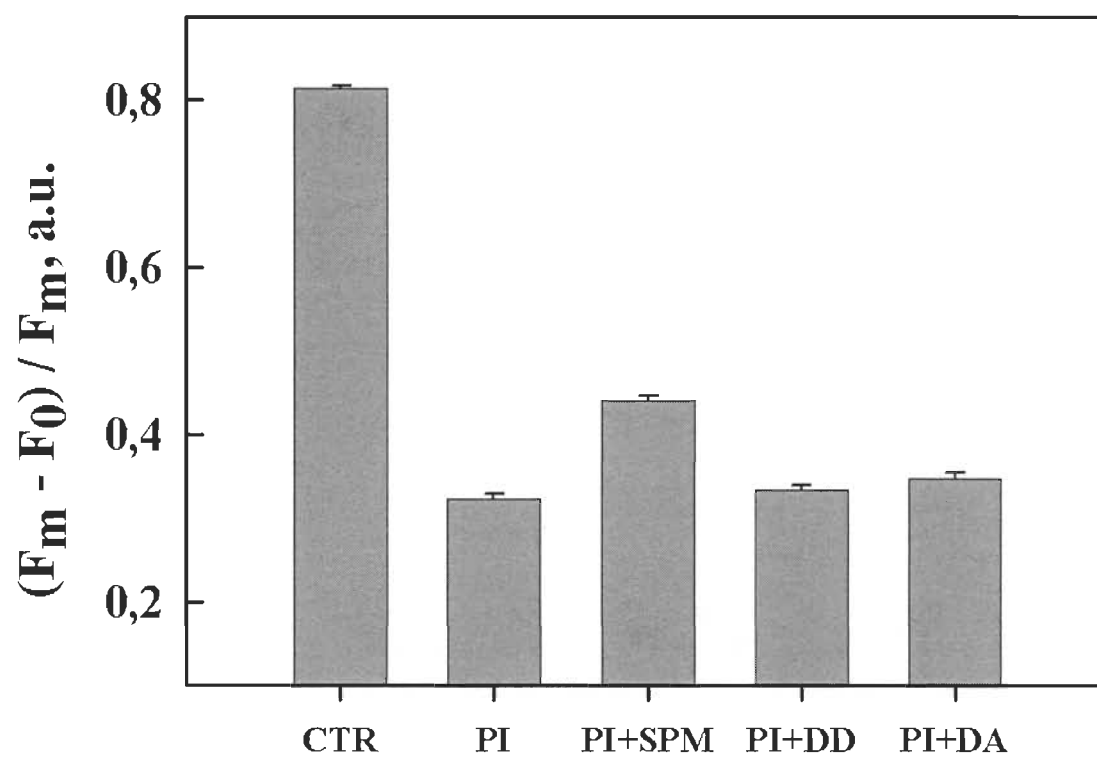
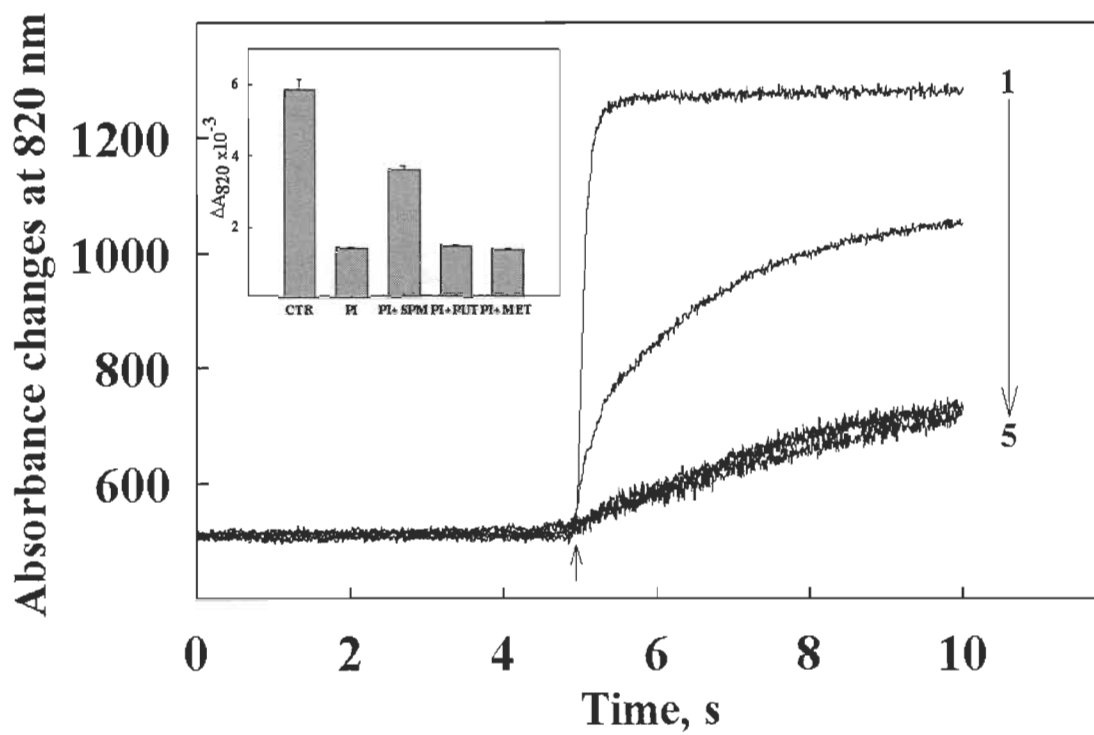


Figure 3



CHAPITRE VII

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Les polyamines endogènes sont des composés organiques indispensables à la croissance et à la différenciation cellulaire chez les plantes. En plus, elles sont réputées pour empêcher la propagation des FAO et la peroxydation des lipides membranaires durant les conditions de stress (78,79,90,123). Les polyamines sont impliquées aussi dans les mécanismes de protection de l'appareil photosynthétique, lequel représente la cible principale de plusieurs stress abiotiques. En effet, l'accumulation de polyamines dans les chloroplastes a permis aux plantes de limiter les effets néfastes causés par les stress via différents mécanismes, la plupart restent inconnus. Cependant, les plantes incapables de synthétiser les polyamines d'une manière adéquate ont exhibé une grande sensibilité. Bien que les polyamines endogènes soient bénéfiques pour l'activité photosynthétique, le rôle de chaque polyamine dans cette protection reste ambigu.

L'objectif principal de cette étude était de caractériser l'effet de charges positives de polyamines sur l'activité photosynthétique. Les résultats obtenus ont permis d'élucider deux principaux aspects. Le premier aspect consistait à éclaircir les mécanismes d'action de polyamines et leurs effets sur l'activité photosynthétique. Le second aspect consistait à vérifier le rôle de charges positives de polyamines dans les mécanismes de protection de l'appareil photosynthétique durant la photoinhibition. Tous ces résultats obtenus ont confirmé nos hypothèses de départ et ont démontré l'atteinte des objectifs visés.

7.1 Sites d'action de la MET et son effet sur l'activité photosynthétique

Dans les travaux du chapitre III, les interactions entre la MET et la membrane de thylakoïdes ont été caractérisées moyennant différentes techniques spectroscopiques et biochimiques à savoir, la mesure du dégagement d'O₂, l'induction de la fluorescence, la

thermoluminescence et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les objectifs spécifiques de cette étude consistaient à identifier les sites d'action potentiels de la MET et son effet sur l'activité photosynthétique, afin de comparer les résultats enregistrés avec ceux des polyamines SPM et PUT.

Les résultats du dégagement d'O₂ ont fourni des données préliminaires suggérant une interaction possible entre la MET et le CEO. En effet, les figures 1A et 1B (chapitre III) ont montré que la MET a inhibé le dégagement d'O₂ et modifié les patrons d'oscillation du dégagement d'O₂ en fonction du nombre de flash. À faible concentration de MET (< à 10 mM), le maximum du dégagement d'O₂ a été observé après le troisième flash (qui correspond à l'état S₄, après une incubation de l'échantillon à la noirceur). Ce maximum a décalé vers le quatrième flash après l'addition d'une forte concentration de MET (Fig. 1A, tracé 6, chapitre III). Ce décalage a été accompagné par une forte inhibition du dégagement d'O₂ dépassant le seuil de 80 % par rapport au contrôle (Fig. 1B, chapitre III). Cette inhibition suggère que la MET est capable d'interagir avec le CEO en se fixant directement sur le "cluster" de Mn ou bien sur un site proche. Plusieurs études ont suggéré que la MET concurrence avec le chlore pour le site de fixation sur le CEO, sans pour autant se fixer directement sur le "cluster" de Mn. Cependant, d'autres études ont proposé que la MET est capable de concurrencer les molécules d'eau substrat pour le site de fixation au CEO (125-127). Nos résultats suggèrent que l'effet de la MET sur l'activité du CEO dépasse l'effet d'une simple interaction avec le chlore puisque l'addition du chlorure de calcium n'a pas empêché l'inhibition.

Pour élucider le site d'action de la MET sur le CEO, des électrophorèses sur gel de polyacrylamide ont été effectuées avec des PSII traités par différentes concentrations de MET. Les fractions membranaires purifiées de PSII ont été incubées pendant 1 min avec la MET avant d'être centrifugées pour séparer les fractions membranaires des polypeptides qui ont été potentiellement relâchés dans le surnageant. Les résultats ont montré l'absence de trois polypeptides correspondant aux polypeptides extrinsèques du CEO de poids moléculaire de 17, 23 et 33 kDa. Ces polypeptides ont été récupérés au niveau du surnageant obtenu avec les PSII traités par 20 mM de MET (Fig. 1C, colonnes

5 et 6, chapitre III). Les positions apparentes des polypeptides ont coïncidé avec les polypeptides arrachés par le traitement de PSII par le Tris-alkali (Fig. 1C, colonne 7, chapitre III), qui enlève spécifiquement les trois polypeptides extrinsèques du CEO (128).

L'enlèvement des polypeptides extrinsèques du CEO sous l'effet de la forte concentration de MET a coïncidé avec l'inhibition totale du dégagement d'O₂ (Fig. 1B, chapitre III). Ce résultat suggère que la MET est capable d'interagir avec les protéines extrinsèques du CEO affectant son activité et par conséquent le rendement photosynthétique. En effet, l'absence de deux polypeptides (17 et 23 kDa) est capable de diminuer l'affinité entre les ions Ca²⁺ et Cl⁻ avec le CEO (128). Ces cofacteurs sont essentiels pour le maintien de la conformation du CEO (129,130). Pour sa part, la protéine de 33 kDa est connue pour son implication dans le maintien de stabilité du "cluster" de Mn. En son absence, deux à quatre atomes de Mn peuvent disparaître provoquant l'inhibition de l'activité du CEO (131).

L'effet de la MET sur l'activité de transfert d'électrons a été caractérisé avec l'analyse des propriétés de fluorescence de Chl dans les échantillons de thylakoïdes isolés. Les résultats ont montré que la fluorescence initiale F_0 , observée avec les CR dans un état ouvert, a augmenté considérablement suite à une application de 15 mM de MET sur l'échantillon de thylakoïdes (Fig. 2A, chapitre III). Cette augmentation a été vérifiée par une autre technique spectroscopique, utilisant un flash qui induit la fluorescence des Chls à 1 µs de résolution (Fig. 3C, chapitre III). L'augmentation de F_0 est probablement due à la perte d'énergie transférée entre les antennes et le CR. Cette idée explique l'augmentation du pourcentage des coups manqués ("miss": pas d'avancement des états S) et la diminution du pourcentage des coups simples ("hit": avancement simple des états S) enregistrées lors de la mesure du dégagement d'O₂ (Tab. 1, chapitre III). En absence des protéines extrinsèques, l'interaction entre la MET et les parties hydrophiles des antennes internes CP47 et CP43 est probablement réalisable. Cette interaction peut induire le changement de conformation de ces antennes et par la suite la perturbation du transfert d'énergie. Par ailleurs, la fluorescence maximale F_m ,

observée lorsque les CR sont dans un état fermé, a diminué énormément après l'addition d'une forte concentration de MET (> à 10 mM). Ce déclin a coïncidé simultanément avec la diminution du rendement photochimique maximal des PSII, F_v/F_m , ou $F_v = F_m - F_0$ (Fig. 2B, chapitre III) et la diminution du ratio F_v/F_0 (Fig. 2C, chapitre III), un paramètre plus sensible au niveau des variations simultanées dans F_m et F_0 pour la détermination du rendement photochimique maximal (132,133). De plus, les diminutions enregistrées aux niveaux des ratios F_v/F_m et F_v/F_0 ont corrélé parfaitement avec l'inhibition du dégagement d'O₂ et l'enlèvement des protéines extrinsèques. Ce résultat suggère que le CEO est la cible principale de la MET. En effet, l'interaction avec les protéines extrinsèques est capable d'affecter l'activité du CEO et par la suite le rendement photochimique.

Les propriétés de fluorescence des Chls en présence de la MET ont été analysées plus en détail au niveau de la cinétique d'induction de fluorescence. Les tracés d'induction de fluorescence (Fig. 3A, chapitre III) illustrent la réduction progressive des quinones localisées du côté accepteur du PSII avec trois phases désignées O-J, J-I et I-P (134,135). La première phase (O-J) reflète la réduction de la quinone acceptrice primaire du PSII, Q_A, alors que les phases (J-I) et (I-P) peuvent être attribuées à la réduction de la quinone acceptrice secondaire Q_B et du pool de PQ respectivement. La phase J-I est considérée négligeable dans les fractions membranaires enrichies en PSII (136). Le traitement des échantillons de thylakoïdes par une forte concentration de MET (> à 15 mM) a provoqué une forte inhibition de l'induction de fluorescence, observée aux niveaux des phases O-J et I-P. La phase I-P a été affectée en premier lieu (Fig. 3A, tracé 4, chapitre III), ce qui témoigne probablement d'une incapacité du CEO à fournir des électrons au PSII pour réduire ses quinones acceptrices. L'inhibition de l'activité du CEO a corrélé avec la baisse de réduction de Q_A par l'accepteur primaire d'électrons (Fig. 3C, chapitre III). Ce déclin est probablement attribué à la formation de P680⁺, qui se produit lorsque le transfert d'électrons entre Y_Z et P680⁺ est perturbé. En présence de P680⁺, la fluorescence chlorophyllienne du PSII est généralement proche de F_0 (137).

Pour restaurer la cinétique d'induction de fluorescence dans les échantillons de thylakoïdes traités par la MET, le donneur d'électrons artificiel diphénylcarbazine (DPC) a été utilisé. Le DPC peut donner des électrons à Y_Z seulement lorsque les polypeptides extrinsèques associés avec le CEO sont perdus du côté lumen du PSII et que le "cluster" de Mn est dysfonctionnel (138). Nos résultats ont montré que l'addition de 5 mM de DPC à l'échantillon de thylakoïdes n'a pas renversé l'inhibition, ce qui suggère que la MET est capable d'interagir avec Y_Z ou les acides aminés proches, causant la modification structurale de l'acide aminé et par conséquent l'inhibition de transfert d'électrons entre Y_Z et $P680^+$. D'ailleurs, la photooxydation d' Y_Z nécessite une conformation structurale favorisant l'échange de protons avec l'acide aminé His¹⁹⁰ de la protéine D1 (139,140).

La thermoluminescence a été utilisée pour déterminer l'effet de la MET sur les processus de recombinaison des charges dans les membranes de thylakoïdes. En appliquant un accroissement linéaire de la température de 2 à 62°C avec un taux de 0.5°C/s, l'amplitude du signal de thermoluminescence a augmenté considérablement pour atteindre son maximum (T_m) à 37°C dans les échantillons contrôles (Fig. 3B, tracé 1, chapitre III). La bande majeure d'émission observée correspond à la bande B (30°C-40°C) attribuable à la recombinaison entre Q_B^- et le complexe de Mn oxydé, essentiellement dans l'état S_2 (141). Cette bande a diminué progressivement en parallèle avec l'augmentation de la concentration de MET (Fig. 3B, tracés 2-4, chapitre III). À forte concentration de MET (15 mM), la bande B a été totalement inhibée (Fig. 3B, tracé 5, chapitre III). Cette inhibition est probablement due à des modifications dans les propriétés des états S du complexe de Mn en présence de MET. En parallèle avec la baisse d'amplitude de la bande B, un décalage de T_m vers les basses températures a été enregistré. Ce décalage peut être interprété par la théorie d'hétérogénéité dans les populations de PSII, suggérant que les PSII ayant besoin d'une grande énergie d'activation pour déclencher les processus de recombinaison subissent l'effet d'inhibition en premier lieu.

En conclusion, tous ces résultats énumérés ci-dessus suggèrent que le CEO est la cible principale de la MET. À faible concentration, la MET est capable d'affecter le dégagement d'O₂ et le transfert d'électrons entre les différents cofacteurs du PSII. En augmentant la concentration de MET, les protéines extrinsèques du CEO peuvent être arrachées et le transfert d'énergie entre les complexes antennaires du PSII et le CR peut être perturbé. Ces effets indiquent que la MET est capable d'interagir avec les protéines extrinsèques en affectant l'activité du CEO et par la suite le rendement photosynthétique (Fig. 4A, chapitre III). En absence des protéines extrinsèques, la MET est probablement capable d'interagir avec les parties hydrophiles des antennes internes CP47 et CP43, modifiant ainsi le transfert d'énergie entre les antennes et le CR (Fig. 4B, chapitre III).

7.2 Mode d'action de la MET

Dans les travaux du chapitre IV, les interactions entre la MET et les fractions membranaires enrichies en PSII ont été caractérisées par la spectroscopie FTIR, la mesure du dégagement d'O₂ standard, l'induction de la fluorescence et la fluorescence des acides aminés. Les objectifs spécifiques de cette étude consistaient à déterminer les mécanismes d'action au niveau moléculaire de la MET et son effet sur l'activité du PSII, afin de comparer ces résultats avec ceux des polyamines naturelles SPM et PUT.

Le spectre FTIR des fractions membranaires enrichies en PSII est composé principalement d'une bande large de forte intensité à 1659 cm⁻¹, laquelle correspond à la bande protéique amide I, attribuable à l'étirement de la liaison C=O et une bande protéique amide II d'intensité moyenne de 1547 cm⁻¹, principalement attribuable à l'étirement de la liaison C-N et au balancement dans le plan de la liaison N-H (Fig. 3, chapitre IV). Une bande de faible intensité est visible à 1513 cm⁻¹, laquelle est associée aux vibrations de la chaîne latérale de l'acide aminé tyrosine (142-145). Les vibrations d'étirement des liaisons lipidiques de type carbonyle-ester sont observables comme une bande d'intensité moyenne à 1738 cm⁻¹ (146). Une autre bande de forte intensité est visible à 3298 cm⁻¹, laquelle correspond à la bande protéique amide A, attribuable à l'étirement de la liaison N-H (142). Les étirements symétriques et antisymétriques de la

liaison C-H des groupes peptidiques sont observés comme trois bandes étroites à 2955, 2926 et 2870 cm^{-1} dans le spectre du PSII pure (résultat non montré).

Comme les spectres des complexes MET-PSII ne présentaient pas de déplacement majeur dans les bandes spectrales protéiques amide I, amide II, tyrosine et au niveau des vibrations lipidiques situées entre 1800-1500 cm^{-1} , les spectres de différences [(PSII + MET) - (PSII)] ont été déterminés pour caractériser la variation d'intensité de chacune de ces bandes. L'autodéconvolution par transformée de Fourier et l'augmentation de la résolution de la dérivée seconde ont ensuite été utilisées afin de déterminer les structures secondaires des protéines du PSII en présence de MET.

À faible concentration de MET (< 5 mM), des variations non significatives dans l'intensité de la bande protéique amide I, située à 1659 cm^{-1} et la bande amide II à 1548 cm^{-1} ont été enregistrées dans les spectres de différences [(PSII + MET) - (PSII)]. En augmentant la concentration de la MET, des bandes positives ont été observées entre 1659-1658 cm^{-1} et 1549-1548 cm^{-1} dans les spectres de différences de PSII-MET complexes (Fig. 3, diffs. 5,7 et 15 mM, chapitre IV). Les bandes positives observées entre 1659-1658 cm^{-1} sont attribuées à une augmentation de l'intensité de la bande protéique amide I, laquelle est causée par une interaction hydrogène (pont H) entre la MET et les groupes polypeptidiques C=O du PSII. Alors que, les bandes positives observées dans la région 1549-1548 cm^{-1} correspond à une modification de la bande protéique amide II suite à l'interaction hydrogène entre la MET et les groupes polypeptidiques C-N et N-H du PSII. En plus, une bande positive d'une faible intensité a été observée à 1504 cm^{-1} . Cette bande correspond probablement à une modification dans les vibrations de la chaîne latérale de l'acide aminé tyrosine causée par l'interaction avec la MET.

L'analyse quantitative de la structure secondaire des fractions membranaires purifiées de PSII et de ses complexes avec les différentes concentrations de la MET a été réalisée afin d'estimer le degré de modification structurale des protéines (Fig. 4, chapitre IV). La structure secondaire protéique du PSII libre est composée de 50 %

d'hélices α (1654-1660 cm^{-1}), 10 % de feuillets β (1614 et 1637 cm^{-1}), 17 % de coudes β (1670-1678 cm^{-1}), 19 % de pelotes statistiques (1638-1648 cm^{-1}) et 19 % de feuillets β antiparallèles (1680-1691 cm^{-1}). Après l'addition d'une forte concentration de MET (7 et 15 mM), une altération majeure dans la structure secondaire des protéines du PSII a été observée. En effet, les hélices α ont diminué de 50 à 42 % pour le complexe PSII-MET (7 mM) et de 50 à 35 % pour le complexe PSII-MET (15 mM). Cependant, les feuillets β ont augmenté de 10 à 13 % pour le complexe PSII-MET (7 mM) et de 10 à 16 % pour le complexe PSII-MET (15 mM). En parallèle avec cette augmentation, les pelotes statistiques ont augmenté aussi de 19 à 25 % pour le complexe PSII-MET (7 mM) et de 19 à 27 % pour le complexe PSII-MET (15 mM) (Fig. 4, chapitre IV). Tous ces résultats suggèrent que la MET est capable d'interagir avec les protéines du PSII moyennant une liaison hydrogène avec les groupes polypeptidiques C=O, C-N et N-H du PSII.

La mesure du dégagement d' O_2 standard a été utilisée afin de vérifier l'effet de l'interaction hydrogène de la MET avec les protéines du PSII (énumérée ci-dessous) sur l'activité du CEO. Les résultats ont montré qu'à faible concentration de MET (< à 5 mM), l'inhibition du dégagement d' O_2 a été négligeable, alors qu'elle a atteint les 100 % à 12 mM de MET (Fig. 1, chapitre IV). Ce résultat est en parfaite concordance avec ceux obtenus par spectroscopie FTIR. En effet, la forte concentration de MET (7 à 15 mM), ajoutée à l'échantillon du PSII, est capable d'altérer la structure secondaire des protéines, y compris les protéines extrinsèques du PSII, en affectant leurs stabilités et par conséquent l'activité du CEO.

L'effet inhibiteur de la MET sur le transfert d'électrons a été caractérisé avec l'analyse de la cinétique de l'induction de la fluorescence. Les tracés d'induction de fluorescence (Fig. 2B, chapitre IV) illustrent la réduction progressive des quinones localisées du côté accepteur du PSII avec trois phases désignées O-J, J-I et I-P. Les résultats ont montré que l'intensité de la fluorescence chlorophyllienne a diminué progressivement en parallèle avec l'augmentation de la concentration de la MET. À forte concentration de MET (> à 15 mM), l'induction de fluorescence a été limitée à la phase O-J (Fig. 2B, tracés 3 et 4, chapitre IV), ce qui suggère que le CEO est devenu incapable

de fournir les électrons au PSII pour réduire convenablement les quinones localisées du côté accepteur.

Pour valider cette interprétation, l'analyse des propriétés de fluorescence des Chls dans les fractions membranaires purifiées de PSII a été déterminée. La fluorescence initiale F_0 , observée lorsque les CR sont dans un état ouvert, n'a pas été influencée significativement par la MET. Cependant, la fluorescence maximale F_m , observée avec les CR fermés, a diminué considérablement en présence d'une forte concentration de MET (> à 10 mM), entraînant une baisse importante dans le ratio F_v/F_m (Fig. 2A, chapitre IV). Cette baisse a coïncidé parfaitement avec l'inhibition du dégagement d' O_2 et le déclin de la phase I-P, confirmant ainsi que la modification structurale des protéines extrinsèques, observée avec la spectroscopie FTIR, est à l'origine de l'inhibition de l'activité du CEO qui devient incapable de fournir les électrons au côté accepteur du PSII.

La fluorescence des acides aminés dans les fractions membranaires enrichies en PSII et les membranes de thylakoïdes a été caractérisée afin d'élucider l'effet de la MET sur la conformation des protéines. Le spectre d'émission de la fluorescence des fractions membranaires de PSII, excitées à 270 nm, a montré une bande majeure de faible longueur d'ondes (300-315 nm) (Fig. 5A, chapitre IV), attribuable à la fluorescence intrinsèque des acides aminés aromatiques, en particulier le tryptophane (Trp) et la tyrosine (Tyr) (147,148). Il est connu que la fluorescence de Trp est dominante par rapport à celle des autres acides aminés aromatiques, atteignant le rapport (Trp/Tyr = 100/9) dans certains cas (149). En plus, le spectre d'émission de la fluorescence est très influencé par le microenvironnement qui entoure les acides aminés fluorophores. Par exemple, en solution polaire le Trp libre fluoresce à 355 nm (150). Cette bande peut se déplacer à droite ou bien à gauche en parallèle avec le changement de polarité du milieu. Dans notre cas, la bande de fluorescence des fractions membranaires enrichies en PSII a décalé vers les petites longueurs d'ondes (310-315 nm) par rapport à celle obtenue avec les membranes de thylakoïdes (330-340 nm) (Fig. 5A et B, tracé 1, chapitre IV). Ce résultat suggère que l'environnement des fluorophores est devenu apolaire en présence

de détergent apolaire (Triton X-100), utilisé lors de l'isolation des PSII (147,148). Par ailleurs, la bande de fluorescence des membranes de thylakoïdes indique que les fluorophores sont entourés par un milieu majoritairement hydrophile.

L'application exogène de la MET (< 15 mM) n'a pas modifié le spectre de fluorescence des acides aminés aromatiques dans les fractions membranaires enrichies en PSII, quoiqu'une baisse graduelle de l'intensité de la bande a été enregistrée en présence d'une forte concentration de MET (20-30 mM) (Fig. 5A, tracés 2-5, chapitre IV). Cette baisse n'a pas été accompagnée par un décalage vers des longueurs d'ondes différentes. Ce résultat peut être expliqué par l'environnement hydrophobe, entourant le Trp avant et après l'interaction avec la MET, causé par la présence de Triton X-100. Ce détergent est probablement capable de limiter l'accès de MET vers les résidus Trp, ce qui limite l'inhibition. Cependant, la bande de fluorescence des acides aminés aromatiques dans les membranes de thylakoïdes, observée à 340 nm, a subi simultanément la baisse d'intensité et le décalage vers les grandes longueurs d'ondes après l'addition d'une forte concentration de MET (10-30 mM) (Fig. 5B, tracés 2-6, chapitre IV). L'interprétation possible de l'atténuation de la fluorescence des acides aminés stipule qu'une grande fraction de résidus Trp est exposée à un environnement hydrophile, capable de faciliter l'accès de MET. Le décalage de la bande d'intensité de la fluorescence peut être expliqué à son tour par la dénaturation partielle des protéines qui expose les résidus de Trp au milieu de polarité supérieure.

Il est à noter que la dénaturation partielle des protéines du PSII en présence de MET (7 mM), observée par la spectroscopie FTIR (conversion des hélices α en feuillets β), a précédé l'atténuation de la fluorescence des acides aminés aromatiques, qui s'est observée après l'addition d'une grande concentration de MET (20-30 mM) (Fig. 5A, chapitre IV). Cette interprétation suggère que la dénaturation partielle des protéines a augmenté l'accessibilité de la MET vers l'environnement proche des résidus fluorophores, provoquant la baisse de la fluorescence. De plus, d'après les données de la fluorescence des acides aminés, les protéines extrinsèques du PSII ont subi la dénaturation en premier lieu, puisque la concentration de MET qui a atténué légèrement

la fluorescence des acides aminés (20 mM) est suffisante pour inhiber totalement le dégagement d'O₂ (Fig. 1, chapitre IV).

En conclusion, les mesures spectroscopiques utilisées dans cette étude ont montré que la MET est capable de former une liaison hydrogène avec les groupes polypeptidiques C=O, C-N et N-H du PSII. Cette liaison peut entraîner la modification structurale des protéines, en particulier les protéines extrinsèques, affectant ainsi le rendement du CEO et le transfert d'électrons entre les différents cofacteurs du PSII.

7.3 Comparaison entre la MET et les polyamines SPM et PUT

Dans cette partie nous allons comparer entre la MET et les polyamines endogènes SPM et PUT de point de vue: (I) Sites et modes d'action ; (II) Effets inhibiteurs sur le rendement photosynthétique, en se basant sur nos résultats et ceux obtenus dans notre laboratoire (111,112,151).

(I) Sites et modes d'action des amines

D'après les données enregistrées, on peut suggérer que le CEO représente la cible principale de toutes les amines, bien que le degré d'inhibition soit différent. En effet, les résultats du dégagement d'O₂, de thermoluminescence et d'induction de fluorescence ont prouvé l'inhibition de l'activité du CEO en présence des amines. Cette inhibition est probablement causée par une interaction entre les amines et les protéines extrinsèques allant jusqu'à l'extraction totale de ces dernières.

Pour contourner cette inhibition, le donneur d'électrons artificiel (DPC) a été ajouté. Les résultats enregistrés avec les polyamines ont montré une correction significative de l'inhibition due à la donation directe des électrons à la Tyz (111). Cependant, l'inhibition par la MET n'a pas été corrigée par le DPC, proposant ainsi une interaction possible entre la MET et la Tyz. Vu sa petite taille et le nombre réduit des

charges positives, la MET est probablement capable d'accéder à des sites interdits pour les autres polyamines, tels que la Tyz.

En plus, en absence des protéines extrinsèques, la MET a montré un pouvoir de pénétration à travers la membrane de thylakoïdes plus important comparé aux polyamines. Ce résultat a été suggéré par la mesure de la fluorescence initiale F_0 en présence d'une forte concentration d'amines (30 mM), étant donné que l'augmentation de F_0 peut être expliquée par la modification structurale des antennes internes CP47 et CP43. Les résultats obtenus ont montré que l'augmentation de F_0 a été anti-proportionnelle avec le nombre de charges positives des amines (Fig. 7.1). En effet, l'effet de la MET (avec une seule charge positive) a été le plus important par rapport à la PUT et la SPM ayant respectivement deux et quatre charges positives. Ce résultat confirme l'idée qui stipule que le nombre de charges positives ainsi que la taille sont des facteurs importants qui déterminent le pouvoir de pénétration des amines.

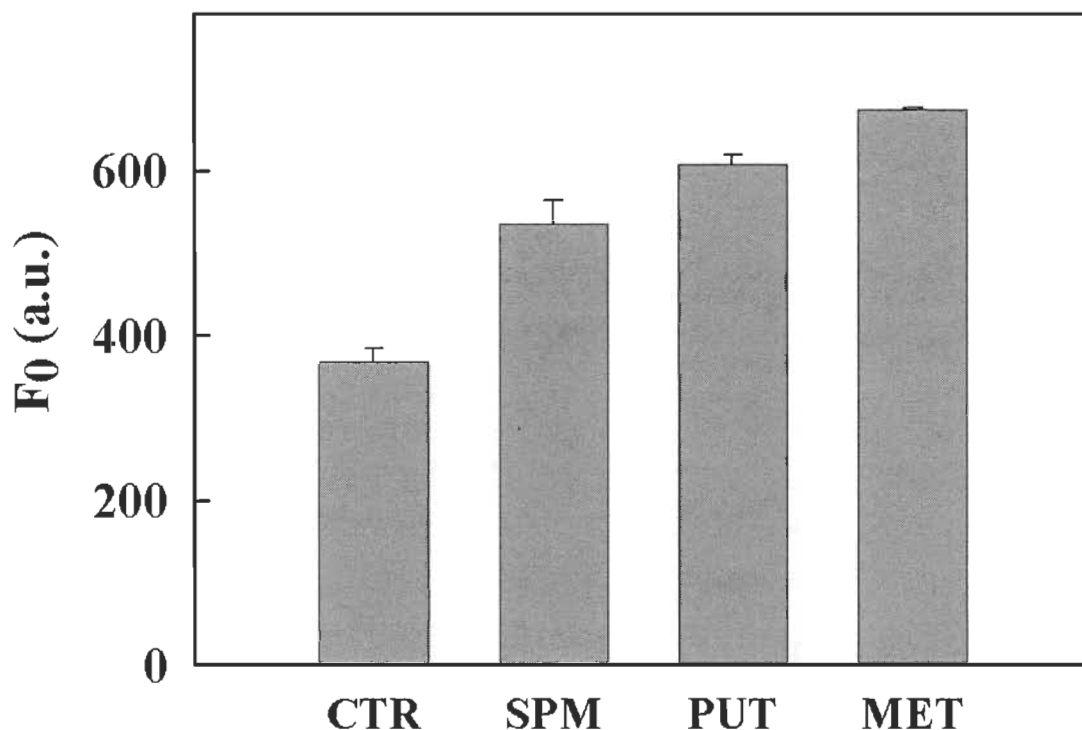


Figure 7.1 : Effet de l'addition de 30 mM d'amines sur la fluorescence initiale F_0 .

D'après les résultats de la spectroscopie FTIR, on peut suggérer que les amines SPM, PUT et MET sont capables d'interagir avec les groupes polypeptidiques C=O, C-N et N-H du PSII, via une liaison hydrogène. Cette interaction induit un changement de conformation des protéines, suite à la conversion des hélices α en feuillets β . Bien que le mode d'interaction des amines avec les protéines du PSII soit le même, le degré de dénaturation des protéines est différent. À faible concentration (5 mM), seule la SPM a provoqué une modification structurale des protéines, suite à la baisse des hélices α de 47 à 40 % et l'augmentation des feuillets β de 11 à 18 % (151), alors que l'effet des amines PUT et MET, à cette même concentration, n'a pas été significatif (112). Ce résultat peut être expliqué par la force des charges positives présentes sur la SPM (+4) comparativement aux PUT (+2) et MET (+1). Cependant, à forte concentration (15-20 mM), la dénaturation des protéines a été plus accentuée en présence de MET, qui a entraîné la baisse des hélices α de 30 % (50 à 35 %), alors que les polyamines SPM et

PUT ont provoqué une baisse de 25 % (47 à 35 %) et 4 % (51 à 49 %) respectivement (Tab. 1, chapitre IV). Ce résultat suggère que la MET (à forte concentration) est capable de pénétrer la partie interne des protéines, vu sa petite taille et le nombre réduit des charges positives, alors que les autres polyamines restent à la surface des protéines, bloquées par leurs charges positives placées tout le long de la chaîne carbonée (surtout celles sur les extrémités).

(II) Effets inhibiteurs des amines

Les analyses spectroscopiques et biochimiques ont montré que les amines SPM, PUT et MET sont capables d'inhiber l'activité du CEO et le transfert d'électrons avec des degrés différents. En effet, 50 % d'inhibition du dégagement d'O₂ et du ratio F_v/F_m a été obtenue avec environ 2 à 3 mM de SPM, 4 à 5 mM de PUT et 10 à 12 de MET (Fig. 7.2). Cela signifie que l'inhibition est proportionnelle avec le nombre de charges positives des amines (SPM > PUT > MET). Pour déterminer le rôle de la longueur de la chaîne carbonée des amines dans cette inhibition, plusieurs essais ont été effectués. La MET a été comparée avec l'éthylamine et la buthylamine ayant une seule charge positive et deux et quatre carbones respectivement. De même, la PUT a été comparée avec la diaminopropane et la cadaverine ayant deux charges positives et trois et cinq carbones respectivement. Les résultats obtenus ont montrés un effet similaire entre toutes ces amines, suggérant ainsi que seules les charges positives des amines peuvent influencer l'inhibition de l'activité du PSII.

En conclusion, l'étude comparative entre les trois amines SPM, PUT et MET a suggéré que les charges positives jouent un rôle prépondérant dans les mécanismes d'action et le degré d'inhibition des amines sur l'activité photosynthétique. En effet, la SPM, ayant le plus grand nombre de charges positives (+4), a exhibé le degré d'inhibition le plus grand, alors que la MET, ayant une seule charge positive a montré le pouvoir de pénétration à travers la membrane de thylakoïdes le plus important. Ces résultats nous ont incités à vérifier le rôle de charges positives des amines dans la protection de l'appareil photosynthétique durant la photoinhibition.

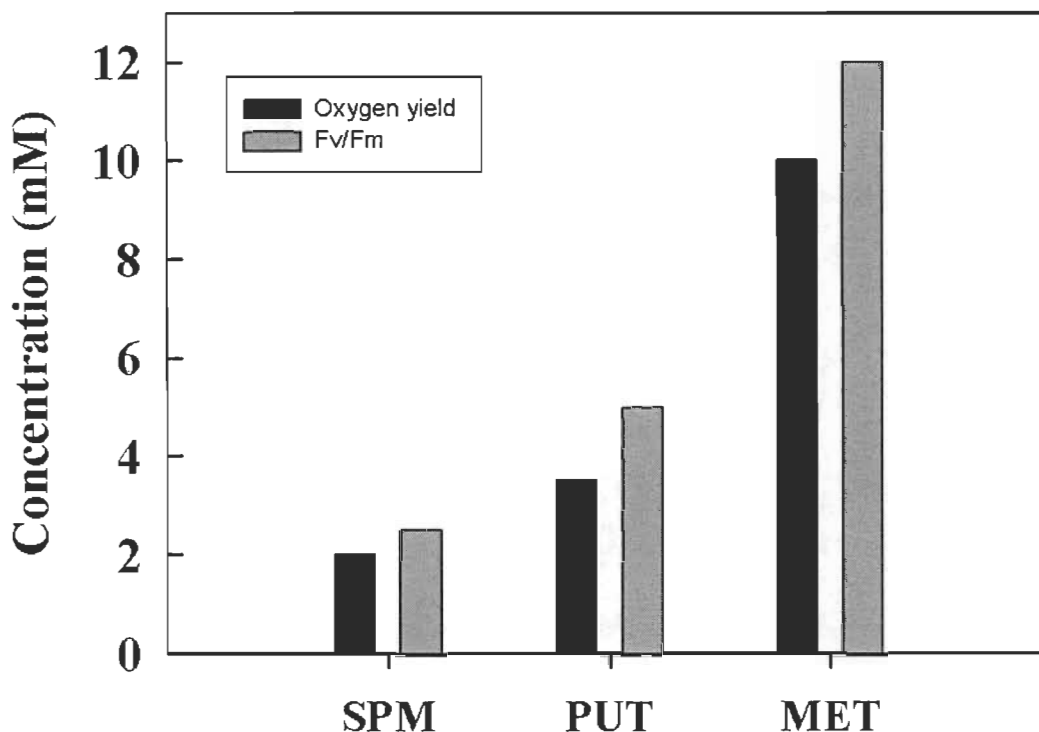


Figure 7.2 : 50 % d'inhibition du dégagement d'O₂ et du ratio F_v/F_m (Tiré de la référence 152).

7.4 Rôle de charges positives des amines dans la protection des photosystèmes contre la photoinhibition

Dans les travaux des chapitres V et VI, le rôle de charges positives des amines (SPM, PUT et MET) dans la protection de l'appareil photosynthétique contre la photoinhibition a été investigué moyennant différentes techniques spectroscopiques à savoir, la mesure du dégagement d'O₂, l'induction de la fluorescence, la thermoluminescence et la photooxydation du P700. Les objectifs spécifiques de ces études consistaient à déterminer l'effet des charges positives des amines sur l'activité des photosystèmes (PSII et PSI) inhibée par la forte intensité lumineuse.

7.4.1 Effet des charges positives des amines sur l'activité du PSII inhibée par la photoinhibition

Il a été suggéré que la forte intensité lumineuse, appliquée dans des conditions *in vitro* sur des échantillons de thylakoïdes, peut déclencher le processus de photoinhibition (24). Ce processus est accompagné par une production excessive des FAO, responsables de la dégradation des composantes de la membrane de thylakoïdes et par conséquent la baisse du rendement photosynthétique. Les résultats obtenus dans le chapitre V ont montré que l'activité du PSII a été sévèrement affectée en réponse à la photoinhibition, appliquée *in vitro*, confirmant ainsi les données bibliographiques.

Les résultats du dégagement d'O₂ ont fourni des données préliminaires suggérant une inhibition quasi-totale de l'activité du CEO suite à l'éclairage de l'échantillon de thylakoïdes par une lumière de forte intensité. En effet, la figure 1 (tracé 5, chapitre V) a montré que la photoinhibition a inhibé le dégagement d'O₂ et modifié les patrons d'oscillation du dégagement d'O₂ en fonction du nombre de flash. Cette inhibition est probablement due à l'accumulation des radicaux (Tyr Z⁺ et P680⁺), capables d'oxyder les résidus des protéines avoisinantes telles que, la protéine D1 et la PsbO, modifiant ainsi leurs conformations (24,124). En plus, le dysfonctionnement du CEO peut faciliter l'accès de l'O₂ au P680 produisant les FAO (OH[•] et O₂^{•-}) responsables de la dégradation de la protéine D1 (23).

L'analyse de la cinétique de la fluorescence, effectuée sur les échantillons de thylakoïdes éclairés par une lumière de forte intensité, nous a permis de suggérer une inhibition considérable au niveau des côtés donneur et accepteur du PSII, causant une altération majeure dans son fonctionnement. En effet, la figure 2 (tracé 4, chapitre V) a montré un grand déclin dans les phases O-J et I-P en réponse à la photoinhibition, ce qui peut se traduire d'une part par l'incapacité du côté donneur (CEO) à fournir les électrons pour réduire les quinones acceptrices du PSII, d'autre part par le dysfonctionnement des PQ causé par la forte intensité lumineuse. L'idée de l'inhibition du côté accepteur par la photoinhibition a été proposée ces dernières années par plusieurs auteurs (39-41), suggérant que la réduction prolongée et la dissociation de Q_A de son site de fixation

peuvent augmenter la probabilité d'une recombinaison entre la Phé^- et le P680^+ , ce qui peut générer la forme triplet excitée ($^3\text{Chl}^*$). Cette dernière est capable d'interagir avec l' O_2 pour donner $^1\text{O}_2$, qui est connu comme étant le plus important dans le mécanisme de dégradation de la protéine D1. En plus, la réduction prolongée de Q_B , après un fort éclairage, peut favoriser l'interaction avec l' O_2 en produisant le radical O_2^- et le radical OH^\cdot . D'après nos résultats obtenus, on peut suggérer que le côté accepteur et le côté donneur peuvent être affectés simultanément par la photoinhibition, avec des degrés différents.

Les mesures de la thermoluminescence, effectuées sur les échantillons de thylakoïdes éclairés par une lumière de forte intensité, ont confirmé la détérioration du PSII au niveau des côtés donneur et accepteur en réponse à la photoinhibition. En effet, la bande B, attribuable à la recombinaison entre Q_B^- et S_2^+ a connu une grande inhibition dans l'échantillon photoinhibé par rapport au témoin (Fig. 3, tracé 5, chapitre V). Cette inhibition témoigne de l'altération de la chaîne du transfert d'électrons causée par la photoinhibition.

Il a été confirmé que les polyamines endogènes peuvent jouer un rôle important dans les mécanismes de défense de la plante contre différents stress abiotiques, en préservant l'activité photosynthétique (102,153,154). En effet, l'augmentation de niveau intracellulaire de polyamines dans les chloroplastes est capable de réguler la réponse de l'appareil photosynthétique vis-à-vis les conditions de stress. Cependant, l'effet de polyamines exogènes, appliquées dans des conditions *in vitro*, reste ambigu. Durant nos expériences menées sur des échantillons de thylakoïdes, éclairés par une lumière de forte intensité, nous avons observé une diminution de l'inhibition en présence de SPM. En effet, l'addition de 1 mM de SPM avant la photoinhibition a augmenté significativement le dégagement d' O_2 , le ratio F_v/F_0 et la bande B par rapport à l'échantillon photoinhibé (Figs. 1, 2 et 3, chapitre V). Par contre, les amines PUT et MET n'ont pas pu protéger l'appareil photosynthétique durant les mêmes conditions. Ces résultats peuvent être expliqués par le nombre élevé de charges positives de la SPM comparativement aux autres amines. Ces charges peuvent interagir avec les parties hydrophiles des protéines

du PSII, via des interactions non covalentes (électrostatique et ou hydrogène), en stabilisant leurs conformations durant les conditions de stress. Il s'est avéré que le nombre élevé de groupes amines chez la SPM aide à renforcer la liaison avec les protéines, ce qui augmente leurs stabilités durant les conditions de stress (155).

Dans le but de confirmer que les charges positives de la SPM jouent probablement le rôle le plus déterminant dans la protection de l'appareil photosynthétique contre la photoinhibition, nous avons comparé la SPM avec deux polyamines ayant le même nombre de carbone (10 carbones), mais un nombre différent de charges positives. En effet, l'échantillon de thylakoïdes, éclairé par une forte intensité lumineuse, a été traité par la SPM (+4 charges) ou par la diamino-décane (DD) (+2) ou la décylamine (DA) (+1) afin de mesurer le ratio F_v/F_m , qui peut estimer l'activité du PSII. Les résultats ont montré que seule la SPM a pu limiter les dégâts causés par la photoinhibition (Fig. 2, chapitre VI), confirmant ainsi le rôle de charges positives des amines dans la protection de l'appareil photosynthétique contre la photoinhibition.

La fluorescence chlorophyllienne à 77 K a été mesurée afin d'étudier l'effet des charges positives des amines sur le détachement des antennes LHCII en réponse à la photoinhibition. À des températures cryogéniques, deux bandes apparaissent à 680 nm et 735 nm, attribuables aux PSII et PSI respectivement (156,157). Après le traitement de l'échantillon de thylakoïdes par une lumière de forte intensité, l'amplitude de la bande de 680 nm a baissé considérablement. Ce résultat témoigne probablement d'un détachement des antennes LHCII du PSII, dû à l'effet répulsif des charges négatives des antennes LHCII. Dans ce contexte, il a été proposé que le non empilement des thylakoïdes en réponse à la photoinhibition soit causé par la répulsion des antennes LHCII (25). Ce détachement est normalement empêché en présence d'une faible concentration de cations inorganiques à savoir, Mg^{2+} et K^+ , capables de neutraliser les charges négatives de LHCII. Nos résultats obtenus ont montré que toutes les amines testées ont augmenté la bande de 680 nm, avec un effet légèrement supérieur attribué à la SPM (Fig. 4, chapitre V). Ce qui suggère que les amines ont pu empêcher le détachement des antennes LHCII probablement de la même manière que les cations

inorganiques, proposant ainsi que le nombre de charges positives des amines est peu influant dans ce type d'interaction.

Étant donné que la protection du PSII contre la photoinhibition est plus significative avec la SPM, la mesure du ratio F_v/F_m en fonction du temps d'éclairage a été effectuée sur un échantillon de thylakoïdes photoinhibé en présence de 1 mM de SPM. Le résultat a montré que l'effet protecteur de la SPM est proportionnel au degré d'inhibition (Fig. 5A, chapitre V), ce qui peut être expliqué par la capacité de la SPM à limiter les dommages causés par la photoinhibition, en préservant l'activité de certains PSII même après 30 min d'éclairage.

Dans le but de déterminer la concentration optimale de SPM nécessaire à la photoprotection, la mesure du ratio F_v/F_m a été effectuée sur un échantillon de thylakoïdes photoinhibé en présence de différentes concentrations de SPM. La figure 5B (chapitre V) a montré que l'activité maximale de PSII a été atteinte en présence de 0.5 à 1 mM de SPM. Au-dessus de cette concentration optimale, la SPM a renforcé l'effet inhibiteur de la forte intensité lumineuse. Ce résultat est en parfaite concordance avec ceux mentionnés dans les chapitres III et IV, lesquels suggèrent que la forte concentration des amines (SPM, PUT et MET) est capable d'affecter la structure secondaire des protéines du PSII, conduisant à la baisse des hélices α et l'augmentation des feuilletts β . Cette modification est responsable de la baisse d'activité du PSII.

Afin de prédire le site de liaison de la SPM sur les protéines du PSII, la technique de modélisation "docking" a été utilisée, en se servant de la structure cristalline du PSII de *Thermosynechococcus elongates*. Cette technique consiste à proposer le meilleur site de liaison, de point de vue énergétique (ΔG la plus faible), entre deux molécules testées. Dans notre cas, le site de liaison le plus favorable de la SPM sur les protéines du PSII est positionné près de la boucle hydrophile de la protéine CP47 au voisinage de la PsbO (Fig. 6A, chapitre V). À cette position, la SPM est entourée par les résidus Glu-1598, Asn-1599, Val-1601, Gly-710, Val-711 et Arg-692 de la protéine CP47, avec une énergie libre de liaison (ΔG) égale à $-6.56 \text{ Kcal mol}^{-1}$ (Fig. 6B, chapitre V). Étant donné

que les protéines CP47 et PsbO des cyanobactéries sont très similaires avec leurs homologues des plantes supérieures, nos résultats suggèrent une interaction non covalente (électrostatique et ou hydrogène) entre la SPM et les parties hydrophiles des protéines du PSII à savoir, la PsbO et la CP47, permettant leurs stabilités durant les conditions de stress.

- Mécanisme de protection proposé

Notre hypothèse de travail stipule que la SPM, appliquée dans des conditions *in vitro* sur un échantillon de thylakoïdes photoinhibé, est capable de stabiliser la conformation des protéines du PSII via des interactions non covalentes (électrostatique et ou hydrogène) avec les parties des protéines exposées au milieu hydrophile. Ces interactions sont effectuées en partie grâce au caractère polycationique de la SPM. En effet, il s'est avéré que les polycations (poly(acide aminé)s) peuvent stabiliser et améliorer l'activité photochimique des photosystèmes, alors que les charges négatives ainsi que les poly(acide aminé)s hydrophobes ont été inefficaces (158).

Il a été suggéré que les polyamines sont capables de pénétrer à travers la membrane de thylakoïdes vers le lumen via des canaux ioniques, en particulier le Ca^{2+} , qui sont efficacement modulés par la SPM (96). En plus, la peroxydation des lipides, provoquée par la photoinhibition, peut augmenter la perméabilité de la membrane de thylakoïdes face aux ions (159), ce qui peut faciliter l'accès de SPM au lumen. À cet endroit, la SPM peut interagir avec les fractions hydrophiles des protéines, en particulier la PsbO et la CP47 (Fig. 6, chapitre V), afin de renforcer leur stabilité structurale durant la photoinhibition. En effet, la PsbO est connue par son implication dans la stabilité du "cluster" de Mn ainsi que la protéine D1 en leur conférant une protection contre les FAO et les radicaux cationiques (23-25). Cependant, la PsbO peut être à son tour une cible pour l'attaque des FAO (25), d'où l'intérêt de la protection de cette protéine par la SPM. L'idée de photoprotection du lumen par la SPM confirme certaines investigations qui stipulent que le côté donneur est le premier affecté par la photoinhibition après

l'inactivation du "cluster" de Mn (42-45). Toutefois, la protection du côté accepteur du PSII par la SPM reste toujours envisageable.

En conclusion, parmi les amines testées, seule la SPM (ayant le nombre de charges positives le plus élevé) a pu limiter les dommages causés par la photoinhibition moyennant des interactions non covalentes avec les fractions hydrophiles des protéines du PSII, en particulier celles exposées au lumen. Ainsi on peut déduire que les charges positives placées tout le long de la chaîne carbonée (y compris celles sur les extrémités) servent à maintenir la SPM à la surface, en formant un bouclier capable de stabiliser la conformation des protéines durant les conditions de stress (Fig. 7.3).

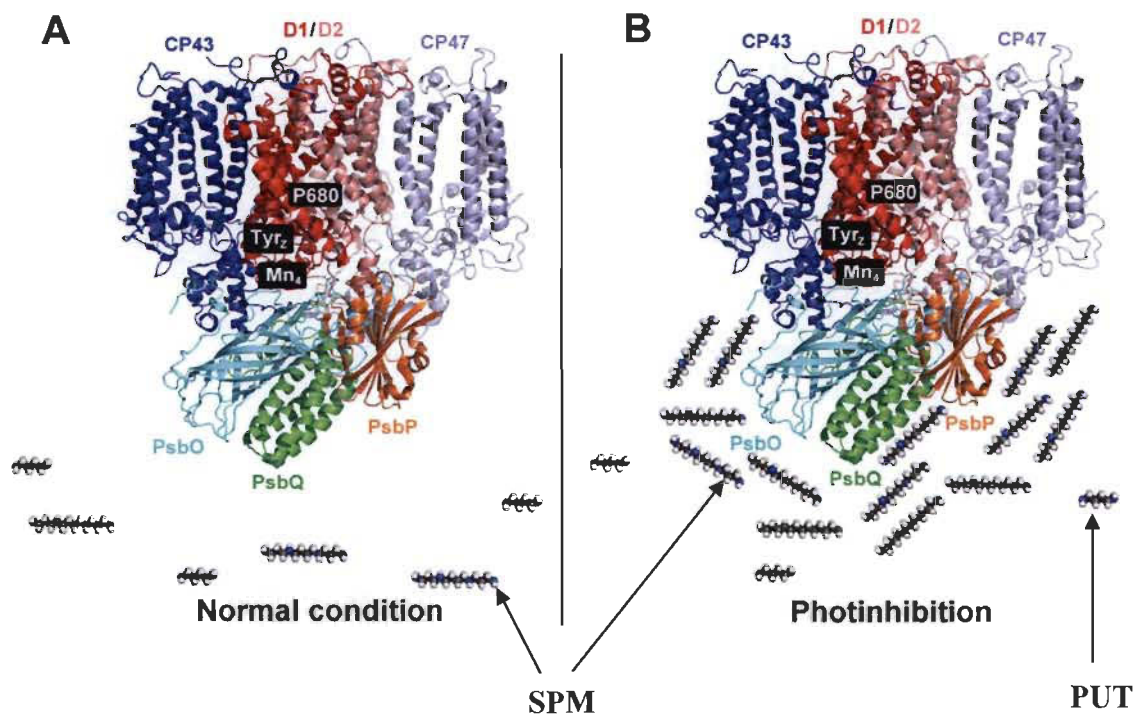


Figure 7.3 : Modèle proposé de la protection de la SPM durant la photoinhibition (Tiré de la référence 152).

7.4.2 Rôle de charges positives des amines dans la protection du PSI contre la photoinhibition

Bien que le PSII soit considéré comme le photosystème le plus affecté par la photoinhibition, dans les conditions *in vivo*, comparé au PSI (40), rien ne permet de croire que le PSI pourrait être préservé totalement des dommages causés par la photoinhibition. Au contraire, plusieurs récentes publications suggèrent que le PSI pourrait être affecté à son tour par la photoinhibition (avec un degré différent), en particulier dans les conditions de basse température (160-162).

La photoinhibition affecte principalement le côté accepteur du PSI et les antennes LHCI, elle débute par la dégradation oxydative du complexe fer-soufre F_A et F_B de la protéine PSI-C par les FAO, causant la dissociation des sous-unités stromales du PSI (163,164). Cependant, plusieurs études ont suggéré que la photoinhibition débute au niveau des antennes LHCI, spécialement à température pièce lorsque les antennes demeurent plus susceptibles à la forte intensité lumineuse (165,166). En effet, les antennes LHCI peuvent se dissocier du CR, suite à l'attaque des FAO, inhibant ainsi le transfert d'excitation vers le P700 et par la suite la baisse d'activité du PSI.

Durant nos expériences effectuées sur des échantillons de thylakoïdes éclairés par une lumière de forte intensité, la photooxydation de P700 a été drastiquement affectée par la photoinhibition, suggérant ainsi une inhibition quasi-totale de l'activité du PSI. En effet, la mesure du changement d'absorbance à 820 nm, qui estime le pourcentage des PSI actifs, a montré que le niveau ainsi que la vitesse de la photooxydation de P700 ont baissé considérablement dans les échantillons photoinhibés, même en présence de DCMU et MV (Fig. 3, tracé 3, chapitre VI). Ce résultat propose que le transfert d'excitation entre les antennes LHCI et le P700 a été affecté, suite à la dissociation des antennes du PSI provoquée par les FAO. Cette hypothèse est en parfaite concordance avec d'autres études qui stipulent que les antennes LHCI subissent une dégradation oxydative durant la photoinhibition, surtout dans des conditions *in vitro* (absence des mécanismes antioxydatifs) et à température ambiante (165,166). Le mécanisme de la dégradation du complexe fer-soufre F_A et F_B de la protéine PSI-C par les FAO peut

expliquer aussi la baisse de niveau ainsi que la vitesse de la photooxydation de P700. En effet, le changement de conformation des polypeptides exposés au stroma du PSI, causé par les FAO, peut entraîner la dissociation des cofacteurs du côté accepteur et par la suite l'inhibition du transfert d'électrons dans le PSI. Cette inhibition peut augmenter la probabilité d'une recombinaison avec les $P700^+$, diminuant ainsi le niveau de la photooxydation et par conséquent l'absorbance à 820 nm.

L'application exogène de la SPM sur les échantillons de thylakoïdes, avant la photoinhibition, a augmenté considérablement le niveau ainsi que la vitesse de la photooxydation de P700, alors que l'effet des amines (PUT et MET) a été non significatif. En effet, la figure 3 (chapitre VI) a montré que le niveau de la photooxydation de P700 a augmenté de 150 % dans l'échantillon photoinhibé et traité par 1 mM de SPM, comparé à l'échantillon photoinhibé. Cette augmentation nous amène à suggérer un rôle protecteur de la SPM dans le PSI. Ayant le nombre de charges positives le plus élevé, la SPM est probablement capable de s'interagir efficacement avec les antennes LHCI et les protéines extrinsèques du PSI, conférant une certaine stabilité durant la photoinhibition et par conséquent une meilleure activité du PSI. Bien que le mécanisme exact de cette protection soit encore inconnu, notre hypothèse de travail stipule que la force des charges positives de la SPM permet une interaction adéquate avec les fractions hydrophiles des protéines du PSI, stabilisant ainsi leurs conformations et limitant leur dissociation provoquée par les FAO.

Il est intéressant de signaler que l'effet protecteur de la SPM a été plus accentué sur le PSI comparé au PSII. En effet, les résultats énumérés ci-dessus ont montré que l'activité du PSI dans l'échantillon photoinhibé et traité par la SPM a augmenté de 150 % par rapport à l'échantillon photoinhibé. Cependant, l'activité du PSII a augmenté de 40 %, dans les meilleurs des cas, en présence de SPM. Cette différence peut être interprétée par la ségrégation qui existe entre les deux photosystèmes dans la membrane de thylakoïdes. En effet, les PSII sont majoritairement localisés dans la partie empilée de la membrane (grana), alors que les PSI sont localisés dans les lamelles stromatiques et les margines (Fig. 1.2). Ainsi, l'accessibilité de la SPM vers le PSI est amplement

favorisée par rapport au PSII, vu le caractère hydrophilique de la SPM qui limite la pénétration à travers la membrane de thylakoïdes et favorise l'interaction avec les parties hydrophiles des protéines des photosystèmes. En plus, la spécificité de la fixation de la SPM sur les protéines du PSI permet probablement de mieux protéger les protéines contre les FAO, en stabilisant leurs conformations.

En conclusion, les résultats observés dans les chapitres V et VI ont montré que parmi les amines testées, seule la SPM ayant quatre charges positives a pu limiter les dégâts causés par la photoinhibition. Bien que le mécanisme exact de la protection reste encore ambigu, notre hypothèse stipule que la force des charges positives de la SPM a permis une meilleure interaction avec les fractions hydrophiles des protéines, en formant un bouclier capable de stabiliser leurs conformation durant les conditions de stress. Cette hypothèse n'exclue pas le rôle antioxydant qui peut jouer la SPM afin de limiter la propagation des FAO, générées durant la photoinhibition.

La forte protection du PSI par rapport au PSII, montrée dans nos résultats, pourrait expliquer pourquoi le PSI est plus résistant à la photoinhibition par rapport au PSII dans les conditions *in vivo*, alors que le PSI est beaucoup plus sensible *in vitro*. En effet, les polyamines accompagnées par les composantes antioxydatives jouent probablement un rôle prépondérant dans la protection du PSI contre la photoinhibition. Cette protection apparaît indispensable pour le maintien de l'activité photosynthétique durant les conditions de stress.

Nos résultats ont montré aussi que la concentration optimale pour la protection des photosystèmes contre la photoinhibition se situe entre 0.5 et 1 mM, ce qui confirme certaines études, effectuées dans des conditions *in vivo*, qui stipulent que la concentration de polyamines endogènes peut atteindre l'ordre de quelques millimolaires dans les conditions de stress (50,78-80). Au-delà de cette concentration optimale, nos résultats présentés dans les chapitres III et IV ont montré que les polyamines sont capables d'inhiber l'activité du CEO et perturber le transfert d'électrons à travers les cofacteurs du PSII, via des interactions non covalentes avec les groupes polypeptidiques

C=O, C-N et C-H du PSII. Ainsi la régulation de la concentration intracellulaire de polyamines endogènes apparaît primordiale pour la préservation de l'activité photosynthétique durant les conditions de stress.

7.5 Perspectives de recherche

Dans la première partie du travail (chapitre III et IV), nous avons montré que les polyamines sont capables d'inhiber l'activité du PSII dans l'ordre du millimolaire. Cette inhibition provient d'une interaction non covalente avec les groupes polypeptidique C=O, C-N et C-H du côté lumen du PSII, laquelle interaction déstabilise le CEO en causant l'enlèvement des protéines extrinsèques. Cependant, un point important demeure ambigu: où se fixent exactement les polyamines sur le CEO ? Pour y parvenir, il serait intéressant d'étudier la structure cristalline de ce complexe en présence de polyamines, afin de mieux élucider les mécanismes d'action de polyamines sur le plan moléculaire. Bien que les données cristallographiques du CEO des plantes supérieures demeurent controversées, en raison des modifications structurales qui subissent le site catalytique en réponse aux rayons X (167), la structure cristalline du CEO des cyanobactéries peut être utilisée comme modèle, vu la similitude avec les plantes supérieures.

Il pourrait également être intéressant d'étudier l'interaction entre les polyamines et les protéines extrinsèques isolées, par différentes techniques spectroscopiques à savoir, la spectroscopie FTIR et le dichroïsme circulaire (CD), afin de mieux éclaircir les modes d'action de polyamines en comparant les résultats obtenus avec ceux du complexe PSII-polyamines. Cependant, le plus grand défi de cette étude consisterait à préserver la structure native des protéines extrinsèques après leur isolation.

La deuxième partie du travail (chapitre V et VI) a mis en évidence que la SPM est capable de protéger les photosystèmes contre la photoinhibition dans les conditions *in vitro*, il serait donc important de vérifier ces résultats *in vivo*. Pour y parvenir, il suffit d'estimer l'activité photosynthétique dans les feuilles entières photoinhibées, en présence de la SPM. L'approche moléculaire, qui consiste à surexprimer ou réprimer les

gènes de biosynthèse de la SPM, pourrait être également utilisée dans le but de confirmer les hypothèses de départ.

Enfin, le rôle protecteur des polyamines contre la forte intensité lumineuse et le stress oxydatif qui en résulte pourrait être considéré comme un modèle pour étudier les mécanismes d'action de polyamines dans les cellules animales et humaines soumises à ce type de stress. D'ailleurs, il a été démontré que les concentrations intracellulaires des polyamines augmentent dans les cellules animales cancéreuses comparativement aux cellules saines (168,169).

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

- 1 Mustardy, L., Garab, G. (2003) "Granum revisited. A three dimensional model where things fall into place", *Trends Plant Sci.* 8: 117-122.
- 2 Malkin, R., Niyogi, K. (2001) "Photosynthesis", In *Biochemistry & molecular biology of plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville: Maryland., pp. 568-628.
- 3 Anderson, J. M., Anderson, P. A. (1988) "The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion", *Trends in Biochem. Sci.* 13: 351-355.
- 4 Trissel, H. W., Wilhelm, C. (1993) "Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks?", *Trends in Biochem. Sci.* 18: 415-419.
- 5 Dekker, J. P., Boekema, E. J. (2005) "Supramolecular organisation of thylakoid membrane proteins in green plants" *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 12-39.
- 6 Yakushevskaya, A. E., Keegstra, W., Boekema, E. J., Dekker, J. P., Andersson, J., Ruban, A. V., Horton, P. (2003) "The structure of Photosystem II in Arabidopsis: localization of the CP26 and CP29 antenna complexes", *Biochemistry* 42: 608-613.
- 7 Joly, D. (2007) "Effets des plastoquinones sur la dissipation d'énergie des photosystèmes", *Mémoire de maîtrise*, Université du Québec à Trois-Rivières.
- 8 Thornber, J. P., Morishige, D. T., Anandan, S., Peter, G. F. (1991) "Chlorophyll-carotenoid proteins of higher plant thylakoids: Chlorophylls", Scheer, H., London CRC Press., pp. 549-585.
- 9 Horton, P., Ruban, A. V., Walters, R. G. (1996) "Regulation of light harvesting in green plants", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 655-684.
- 10 Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004) "Crystal structure of spin major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution", *Nature* 428: 287-292.
- 11 Barber, J., Kuhlbrandt, W. (1999) "Photosystem II". *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 469-475.

- 12 Bassi, R., Sandona, D., Croce, R. (1997) "Novel aspect of chlorophyll a/b binding proteins", *Physiol. Plant.* 100: 769-779.
- 13 Green, B. R., Durnford, D. G. (1996) "The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 685-714.
- 14 Bricker, T. M., Ghanotakis, D. F. (1996) "Oxygenic photosynthesis: the light reaction: Introduction to oxygen evolving-complex", Ort, D. F., Yocum, C. F., Kluwer Academic Publisher, Netherland., pp. 113-136.
- 15 Suorsa, M., Aro, E. M. (2007) "Expression, assembly and auxiliary functions of photosystem II oxygen-evolving proteins in higher plants", *Photosynth. Res.* 93: 89-100.
- 16 Roose, J. L., Wegener, K. M., Pakrasi, H. B. (2007) "The extrinsic proteins of Photosystem II", *Photosynth. Res.* 92: 369-387.
- 17 Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., Biesiadka, J. (2005) "Towards complete cofactor arrangement in the 3,0 Å resolution structure of Photosystem II", *Nature* 438: 1040-1044.
- 18 Miyao, M., Murata, N. (1984) "Role of the 33 kDa polypeptide in preserving Mn in photosynthetic oxygen-evolution", *FEBS Lett.* 170: 350-354.
- 19 Enami, I., Okumura, A., Nagao, R., Suzuki, T., Iwai, M., Shen, J. R. (2008) "Structures and Functions of the extrinsic proteins of photosystem II form different species", *Photosynth. Res.* 98: 349-363.
- 20 Lundin, B., Hansson, M., Schoefs, B., Vener, A. V., Spetea, C. (2007) "The Arabidopsis Psb02 protein regulates dephosphorylation and turnover of the photosystem II centre D1 protein", *The Plant Journal* 49: 528-539.
- 21 Bricker, T. M., Burnap, R. L. (2007) "Photosystem II: the light-driven water: plastoquinone oxidoreductase: The extrinsic proteins of photosystem II", Wydrzynski, T. J., Satoh, K., Springer, Dordrecht., pp. 95-120.
- 22 Eaton-Rye, J. J., Murata, N. (1989) "Evidence that the amino-terminus of the 33 kDa extrinsic is required for binding to the photosystem II complex" *Biochim. Biophys. Acta* 977: 219-26.

- 23 Pospisil, P., Arato, A., Liskay, A. K., Rutherford, A. W. (2004) "Hydroxyl radical generation by photosystem II", *Biochemistry* 43: 6783-6792.
- 24 Yamamoto, Y. (2001) "Quality control of photosystem II", *Plant Cell Physiol.* 42: 121-128.
- 25 Yamamoto, Y., Aminaka, R., Yoshioka, M., Khatoon, M., Komayama, K., Takenaka, D., Yamashita, A., Nijo, N., Inagawa, K., Morita, N., Sasaki, T., Yamamoto, Y. (2008) "Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses", *Photosynth. Res.* 98: 589-608.
- 26 Bricker, T. M., (1992) "Oxygen evolution in the absence of the 33 kDa manganese-stabilizing protein", *Biochemistry* 31: 4623-4628.
- 27 Murata, N., Mijao, M., Omata, T., Matsunami, H., Kuwabara, T. (1984) "Stoichiometry of components in the photosynthetic oxygen evolution system of photosystem II particles prepared with Triton X-100 from spinach chloroplast", *Biochim. Biophys. Acta* 765: 363-369.
- 28 Coleman, W. J., Govinjee. (1987) "A model for the mechanism of chloride activation of oxygen evolution in Photosystem II", *Photosynth. Res.* 13: 199-223.
- 29 Seidler, A., Rutherford, A. W. (1996) "The role of the extrinsic 33 kDa protein in Ca^{2+} binding in photosystem II", *Biochemistry* 35: 12104-12110.
- 30 Shen, J. R., Inoue, Y. (1993) "Binding and functional properties of two new extrinsic components, cytochrome c-550 and a 12-kDa protein, in cyanobacterial photosystem II", *Biochemistry* 32: 1825-1832.
- 31 Bondarava, N., Beyer, P., Krieger-Liskay, A. (2005) "Function of the 23 kDa extrinsic protein of photosystem II as a manganese binding protein and its role in photoactivation", *Biochim. Biophys. Acta* 1708: 63-70.
- 32 Summerfield, T. C., Shand, J. A., Bentley, F. K., Eaton-Rye, J. J. (2005) "PsbQ (Sill638) in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is required for photosystem II activity in specific mutants and in nutrient-limiting conditions", *Biochemistry* 44: 805-815.
- 33 Balsera, M., Arellano, J. B., Revuelta, J. V., Rivas, J. L., Hermoso, J.A. (2005) "The 1.49 Å Resolution Crystal Structure of PsbQ from Photosystem II of *Spinacia oleracea* Reveals a PPII Structure in the N-terminal Region", *J. Mol. Biol.* 350: 1051-1060.

- 34 Joliot, P., Barbieri, G., Chabaud, R. (1969) "A new model for the photochemical centers of the system II", *Photochem. Photobiol.* 10: 309-329.
- 35 Kok, B., Forbush, B., McGloin, M. (1970) "Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution. I. A linear four-step mechanism", *Photochem. Photobiol.* 11: 467-475.
- 36 Ben-Shem, A., Frolow, F., Nelson, N. (2003) "The crystal structure of plant Photosystem I", *Nature* 426: 630-635.
- 37 Nelson, N., Ben-Shem, A. (2004) "The complex architecture of oxygenic photosynthesis", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 971-982.
- 38 Aro, E. M., Suorsa, M., Rokka, A., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Saleem, A., Battchikova, N., Rintamäki, E. (2004) "Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes", *J. Exp. Bot.* 56: 347-356.
- 39 Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E. M., Andersson, B. (1992) "Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II. Stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1102: 195-201.
- 40 Tyystjarvi, E. (2008) "Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster", *Coord. Chem. Rev.* 252: 361-376.
- 41 Styring, S., Virgin, I., Ehrenberg, A., Andersson, B. (1990) "Strong light photoinhibition of electron transport in photosystem II. Impairment of the functions of the first quinone acceptor, QA", *Biochim. Biophys. Acta* 1015: 269-278.
- 42 Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I. (2007) "Photoinhibition of photosystem II under environmental stress", *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 414-421.
- 43 Jegerschold, C., Virgin, I., Styring, S. (1990) "Light-dependent degradation of the D1 protein in photosystem II is accelerated after inhibition of the water splitting reaction", *Biochemistry* 29: 6179-6186.
- 44 Callahan, F. E., Becker, D. W., Cheniae, G. M. (1986) "Studies on the photoactivation of the water-oxidizing enzyme", *Plant Physiol.* 82: 261-269.

- 45 Hakala, M., Tuominen, I., Keränen, M., Tyystjärvi, T., Tyystjärvi, E. (2005) "Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of photosystem II", *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 68-80.
- 46 Ohnishi, N., Allakhverdiev, S. I., Takahashi, S., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y., Murata, N. (2005) "Two-Step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center", *Biochemistry* 44: 8494-8499.
- 47 Gilmore, A. M. (1997) "Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves", *Physiol. Plant.* 99: 197-209.
- 48 Tikkanen, M., Piippo, M., Suorsa, M., Sirpio, S., Mulo, P., Vainonen, J., Vener, A., Allahverdiyeva, Y., Aro, E. M. (2006) "State transitions revisited a buffering system for dynamic low light acclimation of *Arabidopsis*", *Plant Mol. Biol.* 62:779-793.
- 49 Khatoon, M., Inagawa, K., Pospíšil, P., Yamashita, A., Yoshioka, M., Lundin, B., Horie, J., Morita, N., Jajoo, A., Yamamoto, Y., Yamamoto, Y. (2009) "Thylakoid unstacking is necessary to avoid further damage to the D1 protein and to facilitate D1 degradation under light stress in spinach thylakoids", *J. Biol. Chem.* 284: 25343-25352.
- 50 Lütz, C., Navakoudis, E., Seidlitz, H. K., Kotzabasis, K. (2005) "Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection", *Biochim. Biophys. Acta* 1710: 24-33.
- 51 Martin-Tanguy, J. (1997) "Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches", *Physiol. Plant* 100: 675-688.
- 52 Yuan, Q., Ray, R. M., Viar, M. J., Johnson, L. R. (2001) "Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells", *Gastrointest Liver Physiol.* 280: 130-138.
- 53 Tabor, C. W., Tabor, H. (1984) "Polyamines", *Annu. Rev. Biochem.* 53: 749-790.
- 54 Jeevanandam, M., Petersen, S. R. (2001) "Clinical role of polyamine analysis: problem and promise", *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 4: 385-390.

- 55 Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. (2008) "Polyamines: essential factors for growth and survival", *Planta* 228: 367-381.
- 56 Hoet, P. H., Nemery, B. (2000) "Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions", *Lung. Cell Moll. Physiol.* 278: 417-433.
- 57 Seiler, N. (2004) "Catabolism of polyamines", *Amino Acids* 26: 217-233.
- 58 Moinard, C., Cynober, L., De Bandt, J. P. (2005) "Polyamines: metabolism and implications in human diseases", *Clinical Nutrition* 24: 184-197.
- 59 Walters, D. R. (2003) "Polyamines and plant disease", *Phytochemistry* 64: 97-107.
- 60 Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. (1999) "Polyamines and environmental challenges: recent development", *Plant Science* 140: 103-125.
- 61 Wallace, H. M. (1996) "Polyamines in human health", *Proc. Nutr. Soc.* 55: 419-431.
- 62 Seidel, E. R., Scemama, J. L. (1997) "Gastrointestinal polyamines and regulation of mucosal growth and function", *J. Nutr. Biochem.* 8:104-111.
- 63 Soulet, D., Gagnon, B., Rivest, S., Audette, M., Poulin, R. (2004) "A fluorescence probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism", *J. Biol. Chem.* 279: 49355-49366.
- 64 Seiler, N., Delcros, J. G., Moulinoux, J. P. (1996) "Polyamine transport in mammalian cells. An update", *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 843-861.
- 65 Ditomaso, J. M., Hart, J. J., Kochian, L. V. (1992) "Transport kinetics and metabolism of exogenously applied putrescine in roots of intact maize seedlings", *Plant Physiol.* 98: 611-620.
- 66 Pistocchi, R., Bagni, N., Creus, J. A. (1987) "Polyamine uptake in carrot cell cultures", *Plant Physiol.* 84:374-380.
- 67 Satriano, J., Isome, M., Casero, R. A., Thomson, S. C., Blantz, R. C. (2001) "Polyamine transport system mediates agmatine transport in mammalian cells", *Cell Physiol.* 281:329-334.

- 68 Thomas, T., Thomas T. J. (2001) "Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications", *Cell Mol. Life Sci.* 58: 244-258.
- 69 Pegg, A. E. (2006) "Regulation of ornithine decarboxylase", *J. Biol. Chem.* 281: 14529–14532.
- 70 Hayashi, S., Murakami, Y., Matsufuji, S. (1996) "Ornithine decarboxylase antienzyme: a novel type of regulatory protein", *Trends Biochem. Sci.* 21: 27-30.
- 71 De Bandt, J. P., Moinarda, C., Cynober, L. (2006) "Métabolisme et fonctions des polyamines ", *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 21: 333-341.
- 72 Kashiwagi, K., Taneja, S. K., Liu, T. Y., Tabor, C. W., Tabor, H. (1990) "Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Biol. Chem.* 265: 22321-22328.
- 73 Xiong, H., Stanly, B. A., Tekwani, B. L., Pegg, A. E. (1997) "Processing of mammalian and plant .S-adenosylmethionine decarboxylase proenzymes", *J. Biol. Chem.* 272: 28342-28348.
- 74 Hanfrey, C., Elliot, K. A., Franceschetti, M., Mayer M. J., Illingworth, C., Michael A. J. (2005) "A dual upstream open reading frame-based autoregulatory circuit controlling polyamine-responsive translation", *J. Biol. Chem.* 280: 39229-39237.
- 75 Bettuzzi, S., Duvalli, P., Astancolle, S., Pinna, C., Roncagliab, R., Boraldia, F., Tiozzoa, R., Sharrardc, M., Cortia, A. (1999) "Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts", *FEBS Lett.* 446: 18-22.
- 76 Wallace, H. M., Fraser, A. V., Hughes, A. (2003) "A perspective of polyamine metabolism", *Biochem. J.* 376: 1-14.
- 77 Li, L., Rao, J. N., Guo, X., Liu, L., Santora, R., Bass, B. L., Wang, J. Y. (2001) "Polyamine depletion stabilizes p53 resulting in inhibition of normal intestinal epithelial cell proliferation", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281: 941-953.
- 78 Liu, J. H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y., Moriguchi, T. (2007) "Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants", *Plant Biotech.* 24 117-126.

- 79 Groppa, M. D., Benavides, M. P. (2008) "Polyamines and abiotic stress: recent advances", *Amino Acids* 34: 35-45.
- 80 Gill, S. S., Tuteja, N. (2010) "Polyamines and abiotic stress tolerance in plants", *Plant Signal Behav.* 5: 26-33.
- 81 Bors, W., Langebartels, C., Michel, C., Sandermann, J. H. (1989) "Polyamine as radical scavengers and protectants against ozone damage", *Phytochemistry* 28: 1589-1595.
- 82 Kitada, M., Igarashi, K., Hirose, S., Kitawaga, H. (1979) "Inhibition by polyamines of lipid peroxide formation in rat liver microsomes", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87: 388-394.
- 83 Tadolini, B. (1988) "Polyamine inhibition of lipid peroxidation", *Biochem. J.* 249: 33-36.
- 84 Navakoudis, E., Lütz, C., Langebartels, C., Lütz-Meindl, U., Kotzabasis, K. (2003) "Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines", *Biochim. Biophys. Acta* 162: 160-169.
- 85 Basu, R., Ghosh, B. (1991) "Polyamines in various rice genotypes with respect to NaCl salinity", *Physiol. Plant.* 82: 575-581.
- 86 Krishnamurthy, R., Bhagwat, K. A. (1989) "Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars", *Plant Physiol.* 91: 500-504.
- 87 Groppa, M. D., Benavides, M. P., Tomaro, M. L. (2003) "Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress", *Plant Sci.* 164: 293-299.
- 88 Jantaro, S., Mäenpää, P., Mulo, P., Incharoensakdi, A. (2003) "Content and biosynthesis of polyamines in salt and osmotically stressed cells of *Synechocystis* sp. PCC 680", *FEMS Microbiol. Lett.* 228: 129-135.
- 89 Liu, J. H., Nada, K., Honda, C., Kitashiba, H., Wen, X. P., Pang, X. M., Moriguchi, T. (2006) "Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response", *J. Exp. Bot.* 57: 2589-2599.

- 90 Alcázar, R., Francisco, M., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A. F., Altabella, T. (2006) "Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress", *Biotechnol. Lett.* 28: 1867-1876.
- 91 Hummel, I., Bourdais, G., Gouesbet, G., Couée, I., Malmberg, R. L., El Amrani, A. (2004) "Differential expression of arginine decarboxylase ADC1 and ADC2 in *Arabidopsis thaliana*: characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development", *New Phyt.* 163: 519-531.
- 92 Vergnolle, C., Vaultier, M. N., Taconnat, L., Renou, J. P., Kader, J. C., Zachowski, A., Ruelland, E. (2005) "The cold-induced early activation of phospholipase C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* cell suspensions", *Physiol.* 139: 1217-1233.
- 93 Capell, T., Bassie, L., Christou, P. (2004) "Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 10: 9909-9914.
- 94 Kasukabe, Y., He, L., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I., Tachibana, S. (2004) "Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*", *Plant Cell Physiol.* 45: 712-722.
- 95 Waie, B., Rajam, M. V. (2003) "Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene", *Plant Science* 164: 727-734.
- 96 Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Takahashi, T., Michael, A. J., Kusano, T. (2007) "A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*", *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 352: 486-490.
- 97 Liu, J., Yu, B.J., Liu, Y.L. (2006) "Effects of spermidine and spermine levels on salt tolerance associated with tonoplast H-ATPase and H-PPase activities in barley roots", *Plant Growth. Regul.* 49: 119-126.
- 98 Demetriou, G., Neonaki, C., Navakoudis, E., Kotzabasis, K. (2007) "Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus: The protective role of polyamines", *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 272-280.

- 99 Standfuss, J., Van Scheltinga, A. C. T., Lamborghini, M., Kühlbrandt, W. (2005) "Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light harvesting complex at 2.5 Å resolution", *EMBO J.* 24: 919-928.
- 100 Sobieszczuk-Nowicka, E., Wieczorek, P., Legocka, J. (2009) "Kinetin affects the level of chloroplast polyamines and transglutaminase activity during senescence of barley leaves", *Acta Biochim. Pol.* 56: 255-259.
- 101 Logothetis, K., Dakanali, S., Ioannidis, N., Kotzabasis, K. (2004) "The impact of high CO₂ concentrations on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines", *J. Plant Physiol.* 161: 715-724.
- 102 Sfichi, L., Ioannidis, N., Kotzabasis, K. (2004) "Thylakoid-associated polyamines adjust the UV-B sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of light-harvesting complex II changes", *Photochem. Photobiol.* 80: 499-506.
- 103 Sfakianaki, M., Sfichi, L., Kotzabasis, K. (2006) "The involvement of LHCII-associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 84: 181-188.
- 104 Duan, H. G., Yuan, S., Liu, W. J., Xi, D. H., Qing, D. H., Liang, H. G., Lin, H. H. (2006) "Effects of exogenous spermidine on photosystem II of wheat seedling under water stress", *J. Integr. Plant Biol.* 48: 920-927.
- 105 Besford, R. T., Richardson, C. M., Campos, J. L., Tiburcio, A.F. (1993) "Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves", *Planta* 189: 201-206.
- 106 Sakurai, I., Hagio, M., Combos, Z., Tyystjarvi, T., Paakkarinen, V., Aro, E. M., Wada, H. (2003) "Requirement of phosphatidylglycerol for maintenance of photosynthetic machinery", *Plant physiol.* 133: 1376-1384.
- 107 Ioannidis, N. E., Kotzabasis, K. (2007) "Effects of polyamines on the functionality of photosynthetic membrane in vivo and in vitro", *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 1372-1382.
- 108 Yamaguchia, K., Takahashia, Y., Berberichb, T., Imaic, A., Miyazakia, A., Takahashic, T., Michaela, A., Kusano, T. (2006) "The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*", *FEBS Lett.* 580: 6783-6788.

- 109 Zheleva, D., Tsonev, T., Sergiev, I., Karanov, E. (1994) "Protective effect of exogenous polyamines against atrazine in pea plants", *J. Plant Growth. Regul.* 13: 203-211.
- 110 Ioannidis, N. E., Sfichi, L., Kotzabasis, K. (2006) "Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis", *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 821-828.
- 111 Beauchemin, R., Gautier, A., Harnois, J., Boisvert, S., Govindachary, S., Carpentier, R. (2007) "Spermine and spermidine inhibition of photosystem II: disassembly of the oxygen evolving complex and consequent perturbation in electron donation from TyrZ to P680+ and the quinone acceptors QA- to QB", *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 905-912.
- 112 Beauchemin, R., Harnois, J., Rouillon, R., Tajmir-Riahi, H. A., Carpentier, R. (2007) "Interaction of polyamines with proteins of photosystem II: Cation binding and photosynthetic oxygen evolution", *J. Mol. Struct.* 833: 169-174.
- 113 Wallace, H. M., Fraser, A. V. (2004) "Inhibitors of polyamine metabolism: Review article", *Amino Acids* 26: 353-365.
- 114 Joly, D., Bigras, C., Harnois, J., Govindachary, S., Carpentier, R. (2005) "Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes", *Photosynth. Res.* 84: 107-112.
- 115 Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E. (1989) "Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy", *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384-394.
- 116 Berthold, D. A., Babcock, G. T., Yocum, C. F. (1981) "A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes EPR and electron-transport properties", *FEBS Lett.* 134: 231-234.
- 117 Ducruet, J. M. (2003) "Chlorophyll thermoluminescence of leaf discs: simple instruments and progress in signal interpretation open the way to new ecophysiological indicators", *J. Exp. Bot.* 54: 2419-2430.
- 118 Bograh, A., Carpentier, R., Tajmir-Riahi, H. A. (1999) "The effect of cholesterol on the solution structure of proteins of photosystem II. Protein secondary structure and photosynthetic oxygen evolution", *J. Colloid Interface Sci.* 210: 118-122.

- 119 He, W. Z., Newell, W. R., Haris, P. I., Chapman, D. I., Barber, J. (1991) "Protein secondary structure of the isolated photosystem II reaction center and conformational changes studied by Fourier transform infrared spectroscopy", *Biochemistry* 30: 4552-4559.
- 120 Byler, D. M., Susi, H. (1986) "Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra", *Biopolymers* 25: 469-487.
- 121 Ahmed, A., Carpentier, R., Tajmir-Riahi, H. A. (1995) "A quantitative secondary structure analysis of the 33 kDa extrinsic polypeptide of photosystem II by FTIR spectroscopy", *FEBS Lett.* 363: 65-68.
- 122 Nakatani, H. Y. (1984) "Photosynthetic oxygen evolution does not require the participation of polypeptides of 16 and 24 kilodaltons", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 299-304.
- 123 Rhee, H. J., Kim, E. J., Lee, J. K. (2007) "Physiological polyamines: simple primordial molecules", *J. Cell Mol. Med.* 11: 685-703.
- 124 Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., Murata, N. (2006) "A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II", *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 742-749.
- 125 Sandusky, P. O., Yocum, C. F. (1986) "The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution: factors affecting nucleophilic displacement of chloride from the oxygen-evolving complex", *Biochim. Biophys. Acta* 849: 85-93.
- 126 Sandusky, P. O., Yocum, C. F. (1986) "The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution: analysis of the effects of chloride and others anions on amine inhibition of the oxygen-evolving complex", *Biochim. Biophys. Acta* 766: 603-611.
- 127 Michael, K. (2003) "Methylamine and its effects on the oxygen evolving ability of PSII and the S2-state multiline signal, in: Cofactors on the donor side of photosystem II investigated with EPR techniques", These, Berlin, Germany, pp. 95-106.
- 128 Seidler, A. (1996) "The extrinsic polypeptides of photosystem II", *Biochim. Biophys. Acta* 1277: 35-60.

- 129 V-Gorkom, H. J., Yocum, C. F. (2005) "The calcium and chloride cofactors: Photosystem II: light-driven water: plastoquinone oxidoreductase", Wydrzynski, T. J., Satoh, K, Springer Dordrecht the Netherlands., pp. 307-327.
- 130 Vrettos, J. S., Brudvig, G. W. (2002) "Water oxidation chemistry of photosystem II", *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 357: 1395-1405.
- 131 Wyman, A. J., Yocum, C. F. (2005) "Structure and activity of the photosystem II manganese-stabilizing protein: role of the conserved disulfide bond", *Photosynth. Res.* 85: 359-372.
- 132 Kana, R., Lazar, D., Prasil, O., Naus, J. (2002) "Experimental and theoretical studies on the excess capacity of Photosystem II", *Photosynth. Res.* 72: 271-284.
- 133 Govindachary, S., Bukhov, N. G., Joly, D., Carpentier, R. (2004) "Photosystem II inhibition by moderate light under low temperature in intact leaves of chilling-sensitive and-tolerant plants", *Physiol. Plant.* 121: 322-333.
- 134 Zhu, X. G., Govindjee, Baker, N. R., desturler, E., Long, S. P. (2005) "Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with Photosystem II", *Planta* 223: 114-133.
- 135 Lazar, D. (2006) "The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology*", *Func. Plant Biol.* 33: 9-30.
- 136 Pospisil, P., Dau, H. (2000) "Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution", *Photosynth. Res.* 65: 41-52.
- 137 Deprez, J., Dobek, A., Geacintov, N. E., Paillotin, G., Breton, J. (1983) "Probing fluorescence induction in chloroplasts on a nanosecond time scale utilizing picosecond laser pulse pairs", *Biochim. Biophys. Acta* 725: 444-454.
- 138 Ghirardi, L. M., Lutton, W. T., Seibert, M. (1996) "Interactions between diphenylcarbazide, zinc, cobalt, and manganese on the oxidizing side of photosystem II", *Biochemistry* 35: 1820-1828.

- 139 Hays, A. M. A., Vassiliev, I. R., Golbeck, G. H., Debus, R. J. (1998) "Role of D1-His190 in proton-coupled electron transfer reactions in photosystem II: a chemical complementation study", *Biochemistry* 39: 11352-11365.
- 140 Westphal, K. L., Simantiris, N. L., Cukier, R. I., Babcock, G. T. (2000) "Effects of Sr²⁺ substitution on the reduction rates of Yz in PSII membranes-evidence for concerted hydrogen-atom transfer in oxygen evolution", *Biochemistry* 39: 16220-16229.
- 141 Sane, P. V. (2004) "Thermoluminescence: a technique for probing photosystem II: photosynthesis research protocols", Carpentier, R, Humana Press, Totova, NJ, USA., pp. 229-248.
- 142 Krimm, S., Bandekar, J. (1986) "Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins", *Adv. Protein Chem.* 38: 181-364.
- 143 MacDonald, G. M., Barry, B. A. (1992) "Difference FT-IR study of a novel biochemical preparation of photosystem II", *Biochemistry* 31: 9848-9856.
- 144 Fabian, H., Schultz, C., Backmann, J., Hahn, U., Saenger, W., Mantsch, H. H., Naumann, D. (1994) "Impact of point mutations on the structure and thermal stability of ribonuclease T1 in aqueous solution probed by fourier transform infrared spectroscopy", *Biochemistry* 33: 10725-10730.
- 145 Noguchi, T., Ono, T. A., Inoue, Y. (1992) "Detection of structural changes upon S1-to-S2 transition in the oxygen-evolving manganese cluster in photosystem II by light-induced fourier transform infrared difference spectroscopy", *Biochemistry* 31: 5953-5956.
- 146 Jackson, M., Mantsch, H. H. (1993) "Biomembrane structure from FT-IR spectroscopy", *Spectrochim. Acta Rev.* 15: 53-69.
- 147 Casals, C., Miguel, E., Perez-Gil, J. (1993) "Tryptophan fluorescence study on the interaction of pulmonary surfactant protein A with phospholipid vesicles", *Biochem. J.* 296: 585-593.
- 148 Louzada, P. R., Sebollela, A., Scaramello, M. E., Ferreira, S. T. (2003) "Predissociated dimers and molten globule monomers in the equilibrium unfolding of yeast glutathione reductase", *Biophys. J.* 85: 3255-3261.
- 149 Cantor, C. R., Schimmel, P. R. (1980) "Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the study of biological structures and function", Freeman, New York.

- 150 Yong, Y., Rong, L., Chunhe, X., Kangcheng, R., Yunkang, S., Govindjee. (2001) "N bromosuccinimide modification of tryptophan 241 at the C-terminus of the manganese stabilizing protein of plant photosystem II influences its structure and function", *Physiol. Plant.* 111: 108-115.
- 151 Bograh, A., Gingras, Y., Tajmir-Riahi, H. A., Carpentier, R. (1997) "The effects of spermine and spermidine on the structure of photosystem II proteins in relation to inhibition of electron transport", *FEBS Lett.* 402: 41-44.
- 152 Hamdani, S., Yaakoubi, H., Carpentier, R. (2011) "Polyamines interaction with thylakoid proteins during stress", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 104: 314-319.
- 153 Kotzabasis, K., Dörnemann, D. (1998) "Differential changes in the photosynthetic pigments and polyamine content during photoadaptation and photoinhibition of the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*", *Z. Naturforsch.* 53: 833-840.
- 154 Legocka, J., Zajchert, I. (1999) "Role of spermidine in the stabilization of the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II during leaf senescence process", *Acta Physiol. Plant.* 21: 127-132.
- 155 Kuznetsov, V. V., Shevyakova, N. I. (2007) "Polyamines and Stress Tolerance of Plants", *Plant Stress* 1: 50-71.
- 156 Bredenkamp, G. J., Baker, N. R. (1990) "Modification of excitation energy distribution to photosystem I by protein phosphorylation and cation depletion during thylakoid biogenesis in wheat", *Photosynth. Res.* 23: 111-117.
- 157 Siffel, P., Hualov, I., Rohacek, K. (2000) "Light-induced quenching of chlorophyll fluorescence at 77 K in leaves, chloroplasts and Photosystem II particles", *Photosynth. Res.* 65: 219-229.
- 158 Matsumoto, K., Zhang, S., Koutsopoulos, S. (2010) "Enhanced electron transfer activity of photosystem I by polycations in aqueous solution", *Biomacromolecules* 11: 3152-3157.
- 159 Schansker, G., van Rensen, J. S. (1996) "Mechanism of photoinhibition in pea thylakoids: effects of irradiance level and pH", *Biochim. Biophys. Acta* 1276: 239-245.

- 160 Aro, E. M., Virgin, I., Andersson, B. (1993) "Photoinhibition of photosystem 2 inactivation, protein damage and turnover", *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113-134.
- 161 Tjus, S. E., Moller, B. L., Scheller, H. V. (1998) "Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures", *Plant Physiol.* 116: 755-764.
- 162 Terashima, I., Funayama, S., Sonoike, K. (1994) "The site of photoinhibition in leaves of *cucumis sativus* l at low-temperatures is photosystem I, not photosystem II", *Planta* 193: 300-306.
- 163 Sonoike, K., Terashima, I. (1994) "Mechanism of photosystem I photoinhibition in leaves of *cucumis-sativus* l", *Planta* 194: 287-293.
- 164 Scheller, H. V., Haldrup, A. (2005) "Photoinhibition of photosystem I" *Planta* 221: 5-8.
- 165 Rajagopal, S., Bukhov, N. G., Carpentier, R. (2003) "Photoinhibitory light-induced changes in the composition of chlorophyll-protein complexes and photochemical activity in photosystem I submembrane fractions", *Photochem. Photobiol.* 77: 284-291.
- 166 Alboresi, A., Ballottari, M., Hienerwadel, R., Giacometti, G. M., Morosinotto, T. (2009) "Antenna complexes protect photosystem I from photoinhibition", *BMC Plant Biol.* 9: 1-14.
- 167 Yano, J., Kern, J., Irrgang, K. D., Latimer, M. J., Bergmann, U., Glatzel, P., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Sauer, K., Messinger, J., Zouni, A., Yachandra, V. K. (2005) "X-ray damage to the Mn₄Ca complex in single crystals of photosystem II: A case study for metalloprotein crystallography", *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102: 12047-12052.
- 168 Loser, C., Folsch, U. R., Paprotny, C., Creutzfeldt, W. (1990) "Polyamine concentrations in pancreatic tissue, serum, and urine of patients with pancreatic cancer", *Pancreas* 5: 119-127.
- 169 Nowels, K., Homma, Y., Seidenfeld, J., Oyasu, R. (1986) "Prevention of inhibitory effects of α -difluoromethylornithine on rat urinary bladder carcinogenesis by exogenous putrescine", *Cancer Biochem. Biophys.* 8: 257-263.